АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV. ВЫП. 5

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,

Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,

Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,

B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,

V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,

W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

К 50-летию со дня смерти великого ученого

ЛУИ ПАСТЕР

ЛУИ ПАСТЕР

1895—1945

28 сентября 1895 г. умер основатель современной микробиологии Луи Пастер.

Только теперь, когда прошло пятьдесят лет, можно действительно оценить то влияние, которое оказали его исследования на развитие кристаллографии, химии, биологии и медицины.

Создав экспериментальный метод в микробиологии, Пастер противопоставил умозрительным гипотезам и словесным спорам безупречные доказательства, полученные с помощью блестящих опытов. Он высоко ценил экспериментальный метод и, выступая с традиционной речью в Академии Наук в Париже, дал следующую характеристику этого «...переданного нам великими умами: Галилеем, Ньютоном, верховного метода, достойного удивления и преклонения. Разум, прибегающий к этому методу, отрешился от всякой посторонней поддержки, от всякого метафизического предрассудка и опирается только на самого себя...»

Все последующее развитие микробиологии было неразрывно связано с экспериментальной проверкой выдвигаемых идей и теорий.

Пятьдесят лет назад Франция потеряла не только выдающегося ученого, но и пламенного патриота своей родины. Победа Пастера над болезнями шелковичных червей, исследования по брожениям, прививки против сибирской язвы — все это способствовало расцвету французской промышленности и сельского хозяйства. Не случайно Пастеру принадлежат слова: «Я всегда соединял мысль о величии науки с величием родины».

Пройдут годы, но труды Пастера не только сохранят свою свежесть и оригинальность, но будут попрежнему источником новых мыслей и гипотез, высказанных, но не развитых Пастером. Образ же великого ученого, его полная напряженного труда жизнь, его страстность в борьбе за новое будут служить примером для каждого, кто любит науку.

РАСООБРАЗОВАНИЕ У ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS И SACCHAROMYCES APICULATUS В УСЛОВИЯХ СИМБИОЗА

Н. Ф. Саенко

Симбиоз виноградных дрожжей Saccharomyces ellipsoideus и Saccharomyces apiculatus чрезвычайно распространен в природе (на плодах и ягодах, в бродящем соке и т. п.), и изучение его как биологического фактора изменчивости и расообразования представляет большой теоретический интерес. Помимо того, изучение симбиоза виноградных дрожжей интересно и с практической стороны. Правильное брожение является одним из факторов рационального виноделия. Постоянное же присутствие в бродящем виноградном соке в первые дни брожения дрожжей S. apiculatus, по мнению целого ряда исследователей, является одной из причин часто наблюдающихся во многих винодельческих районах «недобродов» вин, или слабого, замедленного брожения.

До сего времени вопросам симбиоза дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus исследователи занимались только в связи с изучением влияния S. apiculatus на сбраживающую способность S. ellipsoideus и изменения вкусовых качеств вина. Работ по изменчивости вышеуказанных дрожжей в условиях смешанной культуры в литературе нет.

Основной задачей нашего исследования и является экспериментальное изучение вопросов изменчивости и закономерностей ее у дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus в условиях симбиоза. С этой целью в Институте микробиологии Академии Наук СССР в 1936 г. мной было проведено изучение симбиоза виноградных дрожжей в лабораторных и природных условиях. В качестве объекта были взяты расы S. ellipsoideus и S. apiculatus, выделенные из винограда в Кахетии (Грузия) в 1934—1935 гг. Все штаммы предварительно проверялись на чистоту и основные морфолого-физиологические и культуральные свойства. В наших исследованиях применялись расы, выделенные из одной клетки по методу Линднера. Изучение изменений виноградных дрожжей в смешанных культурах проводилось на жидких и твердых питательных средах. В качестве жидких сред мы пользовались стерильным виноградным и пивным суслом, а в качестве твердых — виноградным и пивным сусло-агаром.

Изменения основных свойств дрожжей наблюдались нами в смешанных культурах при одновременном высеве дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus в жидкую и твердую питательную среду в разных количественных соотношениях (1 : 1, 1 : 3, 1 : 10, 1 : 20, и 1 : 40) и с варьированием сроков подсева дрожжей друг к другу (через 24, 48 и 96 часов).

В результате экспериментальных наблюдений установлено возникновение в смешанных культурах изменений различной степени стойкости. Наряду с изменениями, носящими характер более или менее длительных модификаций, нами получены стойкие изменения, передающиеся по наследству, изменения типа сальтаций. При высевах из смешанных культур на свежую питательную среду (виноградное сусло-агар) получены новые стойкие расы дрожжей S. apiculatus и S. ellipsoideus, отличающиеся от исходной расы рядом культуральных, морфолого-физиологических и биохимических особенностей.

Наибольшие изменения морфолого-физиологических свойств и расообразование наблюдаются при долговременном выращивании дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus в смешанных культурах на жидкой, не обновляемой, постепенно истощающейся среде и в старых комплексных культурах на сусло-агаре. Новообразования также часто получаются путем секториальной изменчивости (появление в колонии сектор-мутанта).

Изменение основных свойств дрожжей S. apiculatus и S. ellipsoideus в условиях симбиоза

При кратковременном совместном развитии дрожжей S. apiculatus и S. ellipsoideus получаются изменения различной степени устойчивости, в зависимости от времени подсева одних дрожжей к другим и преобладания одного из симбионтов в смешанной культуре.

Изменение основных морфологических свойств дрожжей S. ellipsoideus и S. apiculatus в смешанной культуре на виноградном сусле протекает в одной закономерной последовательности — быстрой реакции S. apiculatus на присутствие в сусле S. ellipsoideus, выражающейся в быстром наступлении третьей некробиотической фазы (изменений необратимых).

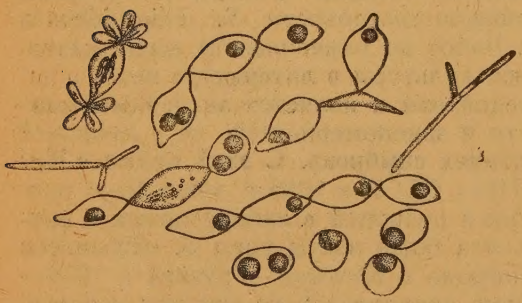


Рис. 1. R-форма S. apiculatus

Рис. 2. Множественное почкование у S. apiculatus

В тех же условиях морфологические изменения S. ellipsoideus незначительны, протекают с той же последовательностью, что и в чистой культуре, и характеризуются как возрастные изменения, возникающие при старении культуры, причем отмечены все фазы изменений живого содержимого клеток S. ellipsoideus (возбуждения, депрессии и некробиоза).

В определенных условиях симбиоза проявляются свойства дрожжей, в чистых культурах не выявляющиеся. Так, при высеве на виноградный сусло-агар молодой смешанной культуры S. ellipsoideus и S. apiculatus со значительным преобладанием последнего наблюдается массовое спорообразование у S. apiculatus, который в чистой культуре аспорогенен. На рис. 1 изображены клетки S. apiculatus со спорами.

При прорастании спор всегда получаются аспорогенные расы. Точно так же раса дрожжей S. ellipsoideus, трудно спорулирующая в чистой культуре, в определенных условиях симбиоза дает споры на средах, на которых в чистой культуре не удается получить споры.

В комбинации с подсевом S. ellipsoideus к 24-часовой культуре S. apiculatus наблюдается множественное почкование у S. apiculatus, причем образующиеся почки часто не достигают полного развития (рис. 2).

Наиболее резкие морфологические изменения отмечены в 14-суточной комплексной культуре на виноградном сусло-агаре. Клетки S. apiculatus из этой культуры сильно деформированы (рис. 3).

Следующим общим изменением в различных условиях симбиоза является появление пигмента у дрожжей S. apiculatus. Появление темноокрашенных, иногда почти черных колоний мы наблюдали постоянно при высевах из смешанных культур на виноградный сусло-агар.

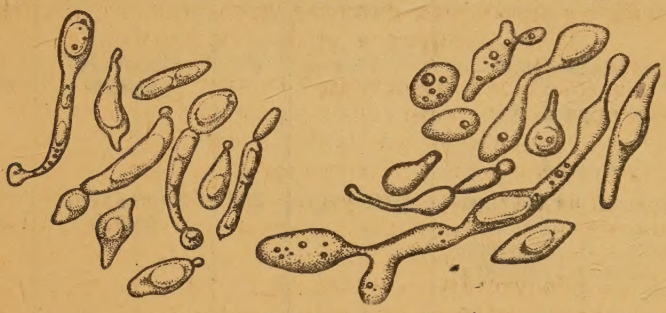


Рис. 3. Комплексная колония на виноградном агаре (14 сут.)

Наиболее часто они обнаруживаются в высевах из смешанных культур на виноградном сусле с преобладанием S. ellipsoideus. В смешанных культурах на сусло-агаре мы также наблюдали появление темноокрашенной зоны в месте соприкосновения колоний S. ellipsoideus и S. apiculatus. Это позволяет думать, что в основе появления пигмента лежит действие продуктов обмена S. ellipsoideus на дрожжи S. apiculatus. Молодые колонии пигмента не имеют, потемнение происходит постепенно, часто отдельными участками, начинаясь с середины колонии, оно может давать коричневые кольца в середине колонии, темную кайму или окрашенный сектор.

У дрожжей S. ellipsoideus появление темноокрашенных колоний мы наблюдали реже.

Появление пигмента у дрожжей S. apiculatus является часто наследственно передаваемым признаком и наблюдается обычно у летальных и сублетальных рас.

При всех условиях симбиоза нами отмечалось появление R-форм у дрожжей S. apiculatus и S. ellipsoideus колоний с бугристой, неровной поверхностью, имеющих реснитчатый или мицелевидно разветвленный край. У S. apiculatus эти формы часто хорошо спорулирующие, резко отличаются от исходной расы расположением и формой клеток (рис. 1). Обычно они нестойки и при пересеве дают гладкие S-формы, аспорогенные. Образование R-форм мы наблюдали также у S. apiculatus при действии прямого солнечного света и температуры. У дрожжей S. ellipsoideus такие R-формы по форме клеток также отличаются от исходной расы, имея удлиненные, иногда микодермального вида клетки. Однако эти формы очень нестойки и при пересевах дают рост нормальных клеток.

У S. ellipsoideus при высеве из старых смешанных культур на пивном и виноградном сусле отмечено появление карликовых колоний, состоящих из сильно угнетенных, с ослабленной жизнедеятельностью клеток. Чаще эти колонии при пересеве дают нормальные колонии или же принадлежат к сублетальным расам и не дают роста на свежей среде.

Расообразование у дрожжей S. apiculatus в условиях симбиоза

Полученные в результате симбиоза новые стойкие расы S. apiculatus A, B, C, D и E в большинстве отличаются от исходной расы своей темной окраской. Некоторые расы, например раса A, в культуральном от-

№ по пор.	Название и происхождение расы	Время получения	Число пересевов	Колонии	
				цвет	поверхноеть
1	Saccharomyces apiculatus Исходная раса K	1934	40	Серовато-белый	Гладкая, блестящая, с ровным краем
	Раса A				
2	Выделена из сектора-мутанта комплексн. колонии с S. ellipsoideus на пивном сусло-агаре	6/VI 1935	30	Серовато-белый	Гладкая, блестящая
	Раса B				
3	Выделена из старой 10-месячной культуры на пивном сусле	10/IV 1936	10	Темнокоричн., по краю светлый	Гладкая, блестящая слегка выпуклая
	Раса C				
4	То же, что и предыдущая	10/IV 1936	10	В середине темнокоричн., по краю светлокоричн.	Гладкая, блестящая, с частыми радиальн. полосками, гладк. краем
	Раса D				
5	Из смешанной культуры на виноградном сусле	11/VI 1936	8	Коричн., по краю светлосерый	Гладкая, блестящая, радиальн. перегородками разделена на секторы
	Раса E				
6	Из старой 10-месячной смешанной культуры на пивном сусле	5/V 1936	10	Светлосерый, в середине темнокоричн., секторы коричн.	Гладкая, блестящая, слегка выпуклая, в середине радиальными бороздками разделена на секторы
	Раса F				
7	Получена при расщеплении расы A	6/VI 1936	12	Светлокоричн. с узкой светлой каймой	Гладкая, блестящая, с частыми радиальн. перегородками, фестончатым краем

Таблица 1

Клетки			Рост на виноградном сусле		Рост на виноградной желатине		Брожение							
форма	размер в μ	почкование	кольцо	пленки	разжижение	газообразование	глюкоза	левулеза	манноза	мальтоза	сахароза	галактоза	рафиноза	арабиноза	лактоза
Лимонообразная и овальная	2,37—12,64× ×1,58—3,95	Полярное	+	+	Слабое	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Мицелиевидн. и удлиненно-лимонообразн.	3,16—12,64× ×1,26—3,95	»	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Разнообразн., заостр. удлин., нитевид., лимонообразн., палочков. и микодерм.	2,37—11,07× ×1,26—1,89	»	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
То же	2,37—11,07× ×1,26—2,37	»	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Разнообр., мицелиевидная, удлиненно-лимонообразн.	3,16—14,22× ×1,58—3,16	Полярное и боковое	+	—	+ слабое	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
То же	3,15—14,22× ×1,58—3,16	То же	+	—	+ сильн.	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
» »	3,16—12,64× ×1,26—3,95	Полярное	+	+	+ сильн.	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—

ношении не отличаются от исходной расы, в морфологическом и физиологическом отношении имеют резкие отличия.

Изучение основных свойств выделенных новых рас S. apiculatus производилось после выделения их в чистой культуре из одной клетки по методу Линднера. На рис. 4 представлены расы S. apiculatus, слева вверху исходная раса, а справа и ниже расы, полученные в результате симбиоза.

Рис. 4

a) S. apiculatus. Исходная раса K. b) S. apiculatus. Раса B и C. c) S. apiculatus. Раса A

Рисунки показывают значительные различия в величине и форме клеток рас, полученных экспериментально по сравнению с исходной расой K и между собой. Исходная раса K состоит из лимонообразных и овальных клеток, образующих почку на заостренном конце клетки.

Одни из рас, полученных экспериментально, имеют очень узкие и мелкие клетки, нитевидной, палочковидной, удлиненно-лимонообразных и микодермальной формы (расы B и C). Другие же расы A. D и E имеют крупные мицелевидные клетки, среди которых в небольшом количестве имеются удлиненно-лимонообразные клетки. Почкование у рас D и E иногда боковое, причем почки в некоторых случаях имеют вид длинных нитей.

Способность спорообразования у всех рас, в том числе и у контрольной, отсутствует [1].

Характерные особенности исходной и экспериментальных рас представлены в табл. 1.

В характере роста на виноградном сусле имеются следующие отличия: одни из рас образуют кольцо и пленку, что сближает их с исходной расой, другие — только кольцо, и третьи не дают ни кольца, ни пленки. На сусло-желатине также имеются различия в характере и интенсивности роста при посеве уколом, что свидетельствует о различном отношении к кислороду; одни из рас являются в большей степени аэробами, чем другие. Способность разжижать желатину, очень слабая у исходной расы, усиливается у рас D и F и совсем отсутствует у рас A, B и C. Все это свидетельствует о выявлении новых физиологических особенностей у полученных путем симбиоза рас S. apiculatus. В отношении сбраживания различных сахаров все расы сходны и не отличаются от исходной расы. Все они сбраживают моносахара — глюкозу, левулезу и маннозу, не сбраживают других сахаров. Замечаются различия в сбраживании виноградного сусла в смысле некоторого повышения бродильной способности у рас C и E и снижения у расы D.

Результаты изучения биохимических свойств выделенных рас S. apiculatus при развитии на виноградном сусле представлены в табл. 2.

Рассматривая таблицу, мы видим различия в способности образовать спирт, накоплении летучих кислот и эфиров. Полученные расы

[1] Спорообразование испытывалось на следующих средах: МПА, среде Городковой, среде Абесадзе (кремнекислый гель), гипсовых блоках, моркови, картофеле.

Таблица 2

№ по пор.	Название культуры	Спирт в % (объемн.)	pH	Общая кислотность ‰ на винную к-ту	Летуч. кислотность ‰ на уксусн. к-ту	Летучие эфиры г/л	Сахар по Бертр. в %
	S. apiculatus						
1	Исходная раса К . . .	2,52	3,52	8,25	1,62	0,3256	13,26
2	Раса А	2,75	3,52	8,00	1,92	0,8240	12,5
3	» В	2,09	3,42	7,75	0,75	1,1968	14,0
4	» С	3,00	3,60	7,75	0,63	0,8536	12,5
5	» D	1,49	3,27	7,75	1,05	0,6776	—
6	» Е	3,05	3,52	8,00	0,73	0,792	—
7	» F	2,72	3,27	8,00	2,01	0,6512	—

представляют собой как плюс-, так и минус-варианты. У одних замечается усиление определенных функциональных способностей, например: образование спирта (раса Е дает на 21% больше спирта по сравнению с исходной расой), у других — ослабление (так, раса D дает снижение спирта на 41%). Интересно получение рас, образующих небольшое количество летучих кислот,— у расы С на 60% меньше исходной расы.

Образование большого количества летучих кислот свойственно S. apiculatus вообще. В исследовании большого количества рас S. apiculatus Мюллера-Тургау, Зейферта, Шандерам и др. приводятся количества летучих кислот, всегда превышающие единицу в граммах на литр, считая по уксусной кислоте. Возможно, в уменьшении образования летучих кислот новыми расами S. apiculatus, полученными в результате симбиоза, сказалось влияние дрожжей S. ellipsoideus, с которыми S. apiculatus развивался совместно. Известно, что дрожжи S. ellipsoideus при брожении вообще не образуют большого количества летучих кислот.

pH изменяется незначительно. Образование летучих эфиров увеличивается по сравнению с исходной расой у всех рас.

В специально проведенном опыте установлено более сильное задерживающее влияние новой расы S. epiculatus A на сбраживающую способность S. ellipsoideus. Комплексная культура с этой расой на 6 дней позднее заканчивает брожение, чем с исходной расой S. apiculatus K.

Таким образом, нами установлено некоторое усиление антагонистических свойств у новой расы S. apiculatus, полученной в результате симбиоза с S. ellipsoideus.

Суммируя полученные данные по изучению свойств S. apiculatus при развитии в смешанных культурах с дрожжами S. ellipsoideus, мы устанавливаем разностороннее и глубокое влияние симбиоза этих дрожжей на изменение основных свойств S. apiculatus и расообразование.

Полученные новые расы S. apiculatus удерживали свои свойства в течение долгого времени, трех-четырех лет при 20 и более пересевах. Только раса А начала диссоциировать после 30 пересевов (через 10 мес. после выделения). Блестящая гладкая колония на виноградном сусло-агаре начала по краю давать мицелевидные разветвления, состоящие из длинных четкообразных цепочек лимонообразных клеток с одной или двумя спорами в каждой. Часто эти цепочки клеток заканчиваются густым сплетением очень длинных нитевидных мицелевидных клеток, которые и придают всей колонии слегка пушистый вид. На рис. 1 представлена четкообразная форма.

При пересеве на свежую среду получились колонии с нормальными, т. е. сходными с исходной расой К и расой А, формами и раса F, которая, не отличаясь по морфологическим свойствам от расы А, из которой она получилась при ее расщеплении, показывает ряд изменений физиологических и биохимических свойств. Спорообразующих рас при пересеве не получилось. Полученное расообразование можно представить в виде схемы, изображенной на рис. 5.

Расообразование у дрожжей S. ellipsoideus в условиях симбиоза

В условиях симбиоза дрожжи S. ellipsoideus оказались более стабильными, дающими многочисленные временные изменения, по наследству не передающиеся.

Появление стойких изменений и новых рас с отличными от исходной свойствами мы наблюдали значительно реже, чем у S. apiculatus.

Выделенные новые расы S. ellipsoideus (из одной клетки) резко отличаются от исходной расы характером своих «гигантских колоний». В то время как исходная раса образует совершенно гладкие, несколько выпуклые, блестящие, с гладким краем колонии, желтовато-белые, полученные расы образуют колонии с сильно выпуклым профилем, часто конические, с радиальными полосами, разделенные на секторы, с лопастным неровным, иногда реснитчатым краем. Поверхность у большинства колоний гладкая, матовая, цвет более темный, чем у исходной расы. У некоторых рас цвет колоний темно-коричневый. Большинство клеток в таких колониях сильно угнетено, с уплотненной, богатой жировыми включениями плазмой. Значительное количество клеток с явлениями плазмолиза. Эти культуры в большинстве случаев отличаются ослабленной жизнедеятельностью.

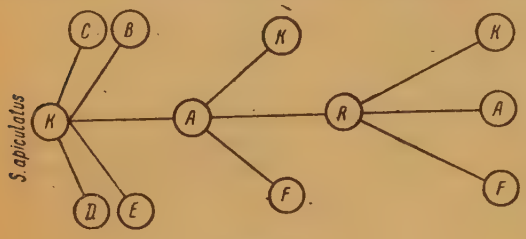


Рис. 5

Полученные новые расы S. ellipsoideus обнаруживают значительные различия в величине и форме клеток. Одни из них имеют более удлиненные и овальные клетки, значительно превышающие по величине исходную расу (расы A, B, C). Другие же, наоборот, имеют более округлую форму и меньшую величину (расы E, G, H). Третьи, наконец, сходны с исходной расой.

Основные морфолого-физиологические свойства выделенных рас и исходной представлены в табл. 3 и 4.

В табл. 3 показаны различия в способности спорообразования. У рас E и F наблюдается усиление этой способности по сравнению с исходной расой, а у расы H отсутствие ее, т. е. получение аспорогенных рас.

У рас A, B и C способность спорообразования по сравнению с контролем снижена. Только единичные клетки в препарате имеют споры. Особенных отличий в характере роста на виноградном сусле и на виноградном сусло-желатине мы не наблюдали. Имеются только отличия в характере и консистенции осадка.

У рас A, B и C наблюдается потеря способности сбраживать мальтозу.

Опытами, проведенными на 20% виноградном сусле, установлены различия в сбраживающей способности полученных путем симбиоза рас S. ellipsoideus как в смысле усиления, так и ослабления этой функции. Раса A на 9% выделила больше CO за то же время, что исходная раса, и выбродила сусло более полно. У расы F период сбраживания укорочен по сравнению с контролем на 3 дня. Наоборот, у расы H период брожения растянут почти вдвое.

Описанные новые расы S. ellipsoideus удерживают свои свойства в течение нескольких лет. Полученные результаты сходны с данными работ сотрудников Института микробиологии Академии Наук СССР по изучению изменения дрожжей под влиянием различных физико-химических факторов (лучистой энергии, химических реагентов и пр.). Мы видим общность этих изменений и одну и ту же направленность их. Это

Таблица 3

№ по пор.	Название и происхождение расы	Время получения	Число пересевов	Клетки вегетативные			Спорообразование						Спороносные клетки	
				форма	величина μ	почкование	гипсов. блок	среда Абесадзе	среда Городковой	щелочн. МПА	морковь	картофель	число спор	форма и величина спор
1	Sacchoromyces ellipsoideus Исходная раса К выделена с винограда в Кахетии	11/IX 1934	40	Овальная и округлая	5,6—8,4× ×4,2—7,0	Полярное	+	+	+	—	+	+	1—4	Круглая
							Не больше 30% спороносных клеток							
	Раса А													
2	Выделена из 10-месячной смешанной культуры на пивном сусле	4/IV 1936	20	То же	5,6—11,2× ×5,6—8,4	Полярн. и периферич.	—	+	+	—	—	—	1—4	»
							Единичные клетки со спорами							
	Раса В													
3	Выделена оттуда же, что и раса А	4/IV 1936	20	Овальная и удлин.-овальная	7—11,12× ×5,6—8,4	Полярное	—	+	+	—	—	—	1—4	»
	Раса С													
4	Оттуда же, что и раса А (отсев из сектора мутанта)	4/IV 1936	20	Овальная	5,6—11,2× ×5,6—8,4	То же	—	+	+	—	—	—	1—2	»
	Раса D													
5	Оттуда же, что и раса А	4/IV 1936	20	»	4,2—8,4× ×2,8—7,0	»	—	+	+	—	—	—	1—3	»
							Единичные клетки со спорами							
	Раса Е													
6	Из смешанной культуры на винном сусле на 7-й день брожения	2 /IV 1936	15	Округлая	2,8—7× ×2,8—7	»	—	+	+	+	—	—	1—4	»
							80—90% спор. клеток							

Таблица 4

№ по пор.	Название расы	Время выделения	Гигантская колония: цвет	Гигантская колония: поверхность	Рост на виноградн. сусле 20% сах. (осадок)	Рост на сусло-желатине (посев уколом): характер роста	разжижен.	газообр.	Брожение: глюкоза	левулеза	манноза	сахароза	мальтоза	галактоза	рафиноза	а збиноза	лактоза
1	Saccharomyces ellipsoideus	11/IX 1934	Серовато-белый в середине желтоватый	Гладкая, блестящая	Серый, мелкопесчан. легко взмучив.	По всей линии укола	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
2	Исходная раса К																
	Раса А	4/IV 1936	Серовато-белый с коричн. серед. и краем	Гладкая, блестящая слегка выпуклая, с мелко фестонч. краем	Буроватосерый песчан. легко взмучив.	То же	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—
3	Раса В	6/IV 1936	Серовато-белый, в середине светлокоричн.	Гладкая, блестящая, с мелкими радиальн. полосками и мелкофестонч. краем	Буроватый, пастообразн., плотный, не взмучивается	» »	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—
4	Раса С	4/IV 1936	Серый, в середине коричн.	То же	Серовато - бурый, мелкопесчанист., легко взмучив.	» »	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—
5	Раса D	4/IV 1936	Серовато-белый, в середине желтовато-бурый	Гладкая, блестящая	Желтовато-серый, мелко-песчан., трудно взмучивается	» »	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—
6	Раса Е	23/IV 1936	Желтовато-серый	То же	Серовато-бурый, хлопьев., песч., легко взмуч.	» »	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
7	Раса D	23/IV 1936	Светлокоричневый	Гладкая блестящая, с радиальн. исчерченностью	Серый, песчан., плотный, не взмучивается	По штриху рост вдавл.	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
8	Раса F	20/IV 1936	Белый, в середине желтоватый	Гладкая, блестящая	Буровато-серый, песчанист., легко взмучив.	То же	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
9	Раса Н	28/IV 1936	Желтовато-серый	Гладкая, блестящая, слегка коническ., с радиальн. бороздк.	То же	По штриху вдавл.	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—

позволяет считать симбиоз одним из значительных факторов изменчивости, тем более важным, что в природе мы имеем дело всегда с ассоциацией микробов, а не с отдельными представителями их. Обнаружение в результате симбиоза у дрожжей некоторых особенностей, не выявляющихся в чистой культуре, например спорообразования у S. apiculatus и потеря некоторыми расами S. ellipsoideus способности сбраживания определенных сахаров, говорит о необходимости пересмотра принципов современной систематики дрожжей, в основу которой положены способность образовать споры и сбраживание различных сахаров.

Выводы

1. В смешанных культурах S. ellipsoideus и S. apiculatus установлено влияние симбиоза на основные свойства дрожжей и расообразование. Наряду с многочисленными временными изменениями получены стойкие изменения, передающиеся по наследству, изменения типа сальтаций.

2. Полученные в результате симбиоза новые стойкие расы S. ellipsoideus и S. apiculatus отличаются от исходной расы рядом морфолого-физиологических и культуральных особенностей и представляют как плюс-, так и минус-варианты.

3. В условиях симбиоза обнаруживаются некоторые свойства дрожжей, отсутствующих в чистой культуре, например спорообразования у S. apiculatus и потеря способности сбраживания мальтозы у S. ellipsoideus.

4. Наблюдаемое в смешанных культурах на виноградном сусле с определенным сочетанием клеток S. ellipsoideus и S. apiculatus стимулирование брожения, сопровождаемое одновременно улучшением вкусовых качеств вина, говорит о рациональности использования в винодельческом производстве комплексных культур дрожжей.

Получено 16.IV.1945

Институт микробиологии
Академии Наук, СССР Москва

FORMATION OF THE RACES IN SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS AND SACCHAROMYCES APICULATUS

N. F. Saenko

Summary

1. In the mixture cultures of S. ellipsoideus and S. apiculatus there was found the influence of symbios upon the profound peculiarities of the yeast and their race formation. Alongside the numerous temporary changes there were obtained the constant hereditary changes of the type of saltations.

2. The new constant races obtained under the influence of symbios are different from the original race in relation to a number of morphophysiological and cultural peculiarities and are both plus and minus variants.

3. Some features of the yeast usually missing in the pure stock were also found under the influence in question. These, for example were: spore-formation in S. apiculatus and the lost of ability to ferment maltose in S. ellipsoideus.

4. The stimulation of fermentation and improvement of the taste qualities of wine usually observed in the mixture cultures on the must when S. ellipsoideus and S. apiculatus cells are mixtured in definite relation shows the expedience of using of the complex yeast cultures in wine production industry.

Institute of Microbiology
of the Acaddemy of Sciences of the USSR

АДАПТАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ. КРАТКОВРЕМЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ

Л. Г. Логинова

Одним из путей эволюционного процесса, ведущего к образованию новых форм микроорганизмов, является адаптация.

Изучение этого процесса у микробов представляет интерес, так как последние довольно легко подвергаются изменению и приспособлению.

Путем приучения микробов к постепенно увеличивающимся дозам каких-либо агентов — физических, химических или биологических — удается в течение нескольких месяцев получить новый вариант, значительно отличающийся от исходного по своим свойствам. Приобретаемые микробами свойства носят временный характер (модификации) и они могут быстро исчезнуть; иногда же происходят стойкие изменения (мутации), передающиеся по наследству.

Известно, что у низших организмов — парамеций такие изменения происходят довольно быстро. Так, Гаузе [1] изучил приспособление чистых линий Paramecium aurelia к повышенной концентрации соли в среде. Он установил, что в течение нескольких дней у всех линий парамеций наблюдалось образование адаптивных модификаций, повышающих их устойчивость к этому фактору.

С неменьшей скоростью приспособительные процессы протекают и у высших растений. Генкелю [2, 3] удалось при полуторачасовой выдержке в солевой среде семян пшеницы и хлопчатника (начальной стадии прорастания) и при последующем высеве их на солончаковые почвы получить значительно большую всхожесть семян по сравнению с семенами, не подвергавшимися такой обработке.

Если у растительных семян непродолжительная однократная обработка дала результаты, то можно было ожидать, что бактерии и дрожжи могут реагировать на кратковременное воздействие еще с большей скоростью.

В этом отношении интересна работа Doudoroff [5], в которой автор указывает, что Escherichia coli жизнеспособны в питательной среде, содержащей 3% NaCl. Однако внезапное перемещение в более концентрированные растворы NaCl они переносят хуже.

Если же эти бактерии выдерживать в течение 60—90 мин. в растворах с постепенно повышающейся концентрацией поваренной соли, то при последующем их пересеве в среды с еще более высоким содержанием NaCl — количество жизнеспособных клеток значительно увеличивается.

В настоящей работе нас интересовало, с какой скоростью могут возникать адаптивные модификации у дрожжей под влиянием внешних воздействий, не являющихся губительными для дрожжей.

Изучалось влияние на дрожжи двух факторов: температуры и повышенной концентрации поваренной соли.

Адаптация к повышенной температуре имеет практическое значение для бродильной промышленности, а изучение солевого фактора удобно и просто при постановке эксперимента.

В качестве объекта были взяты дрожжи Saccharomyces cerevisiae XII раса и дрожжеподобный организм Torulopsis latvica. Последний

был взят для сравнения как не образующий спор и не имеющий полового процесса.

Обе культуры организмов были выделены из одной клетки.

Дрожжи, подвергнутые кратковременному нагреванию или обработке раствором соли, высевались на плотные среды и выращивались при повышенной температуре, или же высев производился на плотные среды, содержащие повышенные концентрации поваренной соли.

Можно было предполагать, что на этих средах появятся адаптивные модификации с повышенной устойчивостью дрожжей к температурному и солевому факторам.

Экспериментальная часть

Опыты с повышенной температурой

Опыты проводились с двухсуточной культурой дрожжей, выросших на сусло-агаре. Вначале была установлена та предельная температура, выше которой рост дрожжей приостанавливался.

С этой целью сбраживалось пивное сусло 7 Блг дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII раса при различной температуре: 35—37—40 и 42°. Эти опыты показали, что при 40° происходит очень слабый рост дрожжей, при более же высокой температуре (42°) размножение дрожжей и брожение полностью приостанавливаются.

В дальнейшем для получения приспособительных вариантов дрожжи подвергались кратковременному действию постепенно повышающейся температуры, а затем выращивались на плотной среде при 39—40°. Для этого предварительно приготовлялась взвесь дрожжевых клеток в стерильной водопроводной воде и из 4-го или 5-го разведения вносилось по 1 мл взвеси клеток в пробирки, содержащие по 9 мл стерильной водопроводной воды.

Дрожжевая суспензия 1-й пробирки была подвергнута действию постепенно повышающейся температуры сначала при 34° в течение 30 мин., затем при 36 и 38° также по 30 мин.

Дрожжи, находящиеся во 2-й пробирке, служили контролем и выдерживались в водопроводной воде при комнатной температуре в течение этого же времени (90 мин.). Затем как из опытной, так и из контрольной пробирок делался высев на сусло-агар (чашки Петри), которые затем помещались в термостат на 2—3 дня при температуре 39—41°. После указанного срока производился подсчет выросших колоний и микроскопические наблюдения.

Повторность каждого опыта была не менее 3—5-кратной.

Результаты исследований представлены в табл. 1. Для более наглядного сравнения полученных цифровых данных количество колоний на чашках при посеве дрожжами, подвергнутыми температурной обработке, принято за 100%.

Мы видим, что кратковременное действие на дрожжи постепенно повышающейся температуры и последующий их высев на плотные среды дает более высокое число выросших колоний при температуре, резко отличающейся от обычного оптимума. При этом наблюдается, что с повышением температуры выращивания количество колоний заметно возрастает. Однако при 42° хотя и вырастает довольно большое количество колоний, но они еще меньше по величине и с коричневатым оттенком. На контрольных чашках при этой температуре дрожжи вообще не вырастают. При перемещении этих чашек в термостат с более низкой температурой (39°) обнаруживается рост колоний, но в значительно меньшем количестве, чем на тех чашках, на которые были высеяны дрожжи, предварительно подвергавшиеся действию повышенной температуры.

Таблица 1

Влияние предварительного кратковременного прогрева дрожжей на их рост при повышенной температуре

Дрожжи	Температура выращивания °С	Количество колоний			
		абсолютное		в %	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Saccharomyces cerevisiae XII раса	38—39	469	786	59,7	100
	39—40	329	1048	31,4	100
	39—40	4	12	33,3	100
	39—40	33	78	42,3	100
	39—40	99	212	46,6	100
	41—42	44	376	11,7	100
Torulopsis latvica	38—39	410	488	84,0	100
	39—40	170	340	50,0	100
	41 42	18	211	8,5	100
	41—42	38	454	8,3	100
	41—42	26	334	7,7	100

Ниже приводятся данные одного из опытов, где посев на чашки был произведен одним и тем же количеством дрожжевой взвеси как предварительно прогретой вышеописанным способом, так и не прогретой, и чашки поставлены в термостат при различной температуре (табл. 2)

Таблица 2

Влияние предварительного прогрева дрожжей на их рост при различной повышенной температуре

Дрожжи	Температура выращивания °С	Количество колоний	
		контроль	опыт
Saccharomyces cerevisiae . . . . XII раса	38—39	469	787
	40	329	1048

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что такое непродолжительное действие постепенно повышающейся температуры на дрожжи способствует более интенсивному их развитию при высоких температурах (рис. 1 и 2).

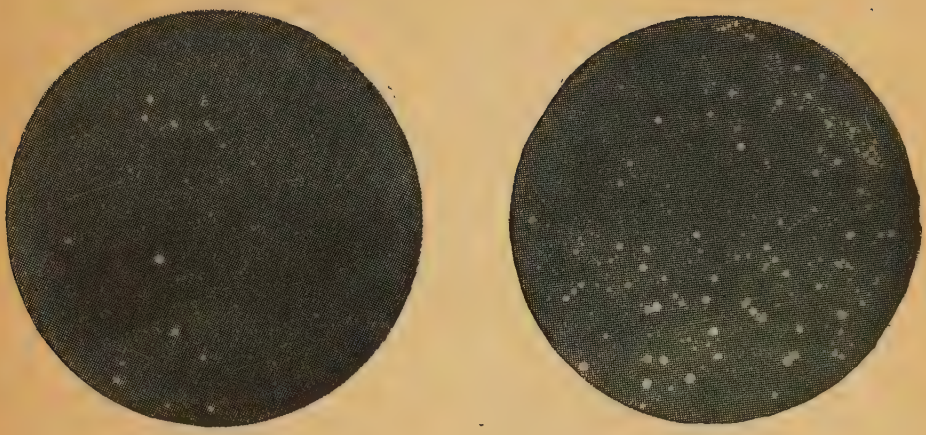
Отсутствие размножения клеток при нагревании

В вышеупомянутых опытах было показано, что дрожжи, находясь непродолжительное время в чистоводной среде и подвергаясь действию последовательно повышающейся температуры, претерпевают некоторые физиологические изменения, способствующие наиболее интенсивному росту их при высокой температуре.

Однако возможно предполагать, что мы имеем дело не с изменчивостью, а с отбором наиболее устойчивых клеток, происходящим при нагревании.

Для выяснения этого вопроса были проведены следующие опыты:

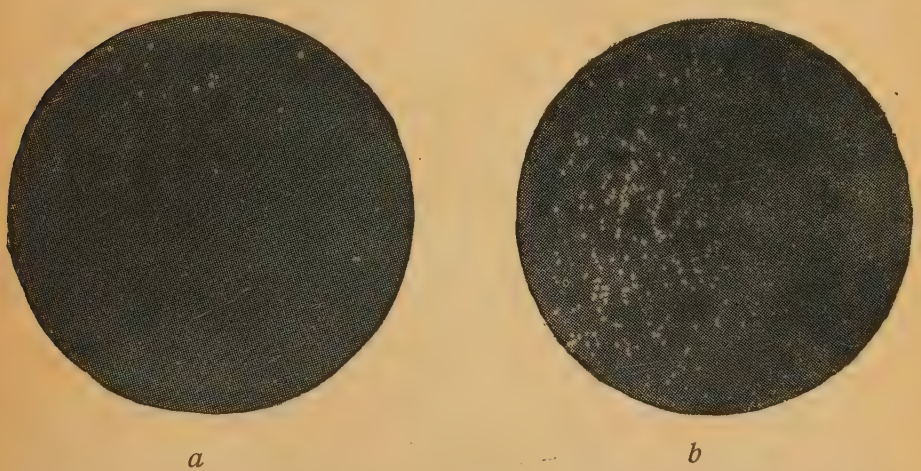
1. Для доказательства отсутствия размножения у дрожжей производился подсчет клеток в камере Turk'a до и после температурного воздействия, которое, как уже указывалось, продолжалось 90 мин. Для этой же цели в некоторых опытах подсчитывался процент почкующихся клеток.



a *b*

Рис. 1. Колонии дрожжей Saccharomyces cerevisiae XII раса, выращенные при температуре 39—40°

а) Контроль — дрожжи перед высевом на чашке Петри не подвергались действиям повышенной температуры. *b*) Опыт — дрожжи подвергались предварительному температурному воздействию



a *b*

Рис. 2. Колонии дрожжей Torulopsis latvica, выращенные при температуре 40°

а) Контроль — дрожжи перед высевом на чашке Петри не подвергались предварительному действию повышенной температуры. *b*) Опыт — дрожжи перед высевом на чашке Петри подвергались предварительному действию повышенной температуры

2. Были также проведены специальные наблюдения за состоянием почкующихся клеток в висячей капле при исследуемых температурах.

3. Произведен посев на чашки одним и тем же количеством дрожжей, как предварительно прогретых вышеописанным способом, так и не прогретых, и чашки поставлены в термостат при нормальной температуре (30°).

По количеству выросших колоний можно было судить об отсутствии размножения у дрожжей в процессе нагревания.

Применяемые же условия предварительной температурной обработки не должны действовать на дрожжи угнетающе, и число выросших на чашках колоний в обоих случаях будет зависеть только от количества посева

Результаты опытов представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Подсчет дрожжевых клеток, находящихся в водной среде в течение 90 мин. при повышенной и обычной температурах

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Подвергнутые действию повышенной температуры	Выдержанные при комнатной температуре	
		колич. дрожж. клеток в 1 мл. среды в млн.	№ опыта	количество дрожж. клеток в 1 мл среды в млн.
1	Первоначальное количество	2,66	5	0,65
	Через 60 мин.	2,96		0,73
	» 90 »	2,75		0,77
2	Первоначальное количество .	1,09	6	1,31
	Через 60 мин.	1,15		—
	» 90 »	1,10		1,31
3	Первоначальное количество .	1,26		
	Через 60 мин.	1,32		
	» 90 »	1,32		
4	Первоначальное количество .	1,92		
	Через 60 мин.	1,92		
	» 90 »	1,76		

Таблица 4

Подсчет почкующихся дрожжевых клеток, находящихся в водной среде в течение 90 мин. при повышенной и обычной температурах

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Подвергн. действию повышенной температуры % почкующихся клеток	Выдержанные при комнатной температуре	
			№ опыта	% почкующихся клеток
1	Первоначальное количество	3,6	4	3,5
	Через 90 мин.	4,1		3,3
2	Первоначальное количество .	1,5	5	3,8
	Через 90 мин.	1,3		3,4
3	Первоначальное количество .	6,2		
	Через 90 мин.	5,0		

Таким образом, многочисленные опыты показали, что дрожжи, находящиеся такое непродолжительное время (90 мин.) в водной среде, при повышенной температуре не размножались.

Проведенные наблюдения над почкующимися клетками в висячей капле полностью подтвердили, что при вышеуказанных условиях почки различного возраста не способны отделяться от материнской клетки.

Опыты с рассевом дрожжей на чашки также показали, что при

росте последних при 30° количество колоний как на контрольных, так и на опытных чашках было одинаково (табл. 5).

Таблица 5

Влияние предварительного кратковременного прогрева дрожжей на их рост при температуре 30°

Дрожжи	Температура выращивания °С	Количество колоний			
		абсолютное		в %	
		опыт	контроль	опыт	контроль
Saccharomyces cerevisiae	30	10	10	100	100
XII раса	30	21	22	95,4	100

Морфология колоний и клеток дрожжей, выращенных при температуре 39—40°

Форма колоний была совершенно одинаковой как у дрожжей, подвергшихся температурному воздействию, так и у контрольных. Они были круглые с ровными краями, желтоватого оттенка. От колоний дрожжей, выращенных в нормальных температурных условиях, они отличаются значительно меньшей величиной. Так, большинство выросших колоний на чашках, где высев был произведен дрожжами, предварительно прогретыми, имеют диаметр 0,3 мм. Реже встречаются колонии большего размера — 2 мм.

Еще более мелкие колонии наблюдаются в тех случаях, когда дрожжи без предварительной обработки выращивались при 39—40°.

Влияние кратковременного действия температуры на форме клеток почти не сказалось. Отличие выражается лишь в том, что у дрожжей, не подвергавшихся воздействию температуры, чаще встречаются клетки увеличенного размера.

Крупные дрожжевые клетки имеют большую вакуолю, занимающую почти всю клетку,— протоплазма мелко-зернистая и прилегает к стенке клетки. Реже встречаются плазмолизированные дрожжи с крупно-зернистой протоплазмой. Проницаемость к краскам у таких клеток очень увеличена. Попадаются клетки с лопнувшей оболочкой и вышедшим наружу содержимым. Клетки содержат много жира. Метахроматина и гликогена меньше, чем в контрольных посевах дрожжей.

Аналогичные морфологические изменения наблюдаются и у Torulopsis latvica.

Высокое число вырастающих колоний, которые предварительно нагревались, совершенно ясно указывает на образование приспособительных вариантов несмотря на непродолжительность обработки.

Однако длительность нагревания была минимальной. Как показали специально проведенные опыты, при укорачивании срока до 15 мин. (вместо 30 мин.) адаптации не было.

Пассажи адаптивных вариантов при высокой температуре

Проведенными ранее исследованиями (Имшенецкий и Логинова [4]) было установлено, что дрожжи можно довольно легко приучить развиваться при 40°, культивируя, их в течение 5—6 месяцев при постепенно повышающейся температуре. В настоящей работе нас интересовал вопрос, может ли такая кратковременная температурная обработка дрожжей (в течение 90 мин.) сказаться в какой-либо степени и в последующих поколениях при дальнейшем их культивировании при 39—40°.

Для выяснения этого вопроса дрожжи, подвергнутые нагреванию, как обычно, пересевались при вышеуказанной температуре. Затем из 3 и 4-го пассажей был сделан высев дрожжей на чашки Петри и снова произведен подсчет колоний. Оказалось, что и в последующих поколениях (табл. 6) дрожжи, подвергнутые нагреванию, размножались более энергично и, таким образом, количественные различия сохранялись.

Таблица 6

Количество выросших колоний при высеве дрожжей из 3-го и 4-го пассажа при температуре 39—40°

Дрожжи	№ пассажа	Количество колоний			
		абсолютное		в %	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Saccharomyces cerevisiae XII paca	3	167	263	63,1	100
	4	58	89	65,1	100
Torulopsis latvica	3	43	85	50,5	100
	4	62	140	44,2	100

Таким образом, проведенные исследования показали, что в результате кратковременного нагревания дрожжей последние претерпевают некоторые физиологические изменения и при дальнейшем их культивировании при 39—40° развиваются значительно энергичнее по сравнению с дрожжами, не подвергающимися предварительно температурному воздействию.

Следовательно, такой непродолжительный температурный «удар» по клетке способствует более быстрой их акклиматизации при дальнейших пассажах при повышенной температуре. Возможно, что происходящий при этом отбор клеток может привести к образованию мутантов.

Влияние кратковременного нагрева клеток на их способность сбраживать углероды

В дальнейшем мы перешли к изучению влияния кратковременной температурной обработки на бродильную функцию дрожжей. С этой целью дрожжи подвергались обработке, описанной выше.

После выращивания на чашках Петри при температуре 40° в течение 2 суток дрожжи смывались стерильной водопроводной водой и отпрессовывались.

Брожение проводилось в трубках Клейвера. Сбраживанию подвергался раствор сахарозы, приготовленный на фосфатном буфере (pH 5,5) при температуре 39—40°.

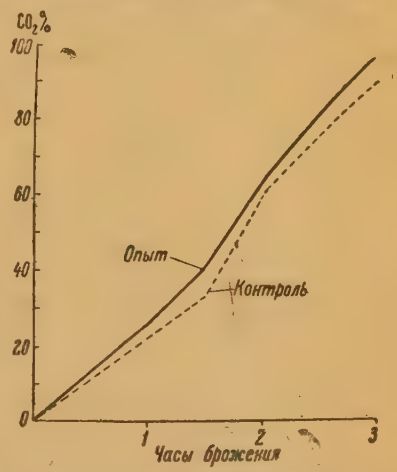


Рис. 3. Сбраживание сахарозы при повышенной температуре дрожжами Saccharomyces cerevisiae, подвергнутыми предварительной температурной обработке (острые опыты)

Дрожжи вносились в количестве 4% к объему среды. Учет выделявшейся углекислоты при брожении проводился в течение 2—3 час. (рис. 3). Мы видим, что брожение при повышенной температуре протекает более активно с теми дрожжами, которые подвергались предварительно кратковременному действию повышенной температуры. Количество выделившейся углекислоты больше на 11—12%. Таким образом, можно сказать с уверенностью, что не только размножение, но и бродильная способность дрожжей при высокой температуре увеличиваются.

Однако это влияние рельефно проявляется в условиях кратковременного опыта при большом количестве дрожжей и в отсутствии размножения. Если же проводить брожение по обычно принятой методике, когда имеет место размножение дрожжей, влияние предварительной температурной обработки сглаживается и количество выделившейся углекислоты одинаково [1].

Таблица 7

Сбраживание сусла при температуре 39—40° дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII раса, предварительно подвергнутыми нагреванию

№ опыта	Дрожжи	Первоначальное количество дрожж. клеток 1 мл среды в млнв.	Количество выделившейся CO_2 из 100 мл среды	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды в млн.
1	Контроль (брожение при 40°)	2,13	2,15	11,22
	Дрожжи подвергались кратковременному действию повышенной температуры (брожение при 40°)	2,13	1,98	12,51
2	Контроль (брожение при 40°)	2,6	0,78	16,62
	Дрожжи подвергались кратковременному действию повышенной температуры (брожение при 40°)	2,6	0,78	17,90
	Контроль (брожение при 30°)	2,6	1,80	55,80

Опыты с хлористым натрием

Помимо повышенной температуры нами изучалось влияние различных концентраций хлористого натрия на жизнедеятельность дрожжей.

Исследования были начаты с определения тех концентраций соли, которые могут выносить дрожжи.

Опыты проводились как с дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII раса, так и с Torulopsis latvica.

При проведении брожения дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII раса на пивном сусле 7 Блг., содержащем различные концентрации поваренной соли, было установлено, что полная задержка процесса брожения и размножения у дрожжей наступает при 7% NaCl. С помощью кратковременной обработки дрожжей повышающимися концентрациями поваренной соли мы пытались добиться образования адаптивных вариантов.

Концентрация поваренной соли в водной суспензии дрожжей повышалась на 1%, и при данной концентрации дрожжи выдерживались в течение получаса. В каждом опыте изучалось 3-кратное изменение концентрации соли и общая продолжительность выдержки равнялась 90 мин.

Таким образом, обработанная суспензия дрожжей высевалась на плотную среду (сусло-агар), содержащую 5—6% хлористого натрия. Следовательно, развитие дрожжей происходило на среде, содержащей почти предельную концентрацию соли.

Данные этих опытов приведены в табл. 8 и 9.

Мы видим, что предварительная кратковременная адаптация к соли значительно увеличила количество выросших колоний по сравнению с контрольными чашками, где производился высев дрожжами, не подвергавшимися предварительной обработке.

Таким образом, мы имеем ту же закономерность, как и при темпе-

[1] Это, повидимому, объясняется тем, что при размножении дрожжей в жидкой среде поколение клеток утрачивает устойчивость.

Таблица 8

Влияние предварительной солевой обработки на размножение дрожжей на среде с солью

Дрожжи	Дрожжи выдерживались предварительно в водном растворе, содержащем след. конц. NaCl в %	Количество колоний на сусло-агаре, содержащем 4,5% NaCl
Saccharomyces cerevisiae . . . XII раса	б/соли	90
	1—2—3	244
Torulopsis latvica	б/соли	82
	1—2—3	354
	3—4—5	41

Таблица 9

Влияние предварительной обработки дрожжей солью на их рост на среде с солью

Дрожжи	Дрожжи выдерживались предварительно в водном растворе, содержащем след. конц. NaCl в %	Количество колоний							
		Концентрация NaCl в среде сусло-агар							
		5%		6%		5%		6%	
		3 дн.	5 дн.	3 дн.	5 дн.	3 дн.	5 дн.	3 дн.	5 дн.
		Контроль				Опыт			
Saccharomyces cerevisiae	0,5—1—2	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	147	351	109	279
	1—2—3	»	»	»	»	497	529	—	184
	2—3—4	»	»	»	»	580	602	—	27
Torulopsis latvica	0,5—1—2	»	»	»	»	—	311	—	220
	1—2—3	»	»	»	»	—	495	—	145
	2—3—4	»	»	»	»	—	550	—	15

ратурной обработке. При этом действие соли проявляется одинаково как по отношению к дрожжам Saccharomyces cerevisiae XII раса, так и к дрожжеподобным грибкам Torulopsis latvica.

Следует отметить, что очень низкие концентрации при кратковременном воздействии солей на дрожжи являются недостаточными, в то время как высокие действуют угнетающе.

Наиболее благоприятной является выдержка дрожжей при концентрации соли (1—2—3%). В этих опытах точно так же выяснилось, размножаются ли дрожжи при кратковременной солевой обработке. Приведенные данные (табл. 10) наглядно иллюстрируют отсутствие почкования у дрожжей при такой непродолжительной их выдержке в растворе соли.

Мы видим, что увеличение количества выросших колоний следует отнести только за счет образования приспособительных вариантов у испытанных нами микроорганизмов.

Специфичность действия изучавшихся факторов

Из всего вышеизложенного мы видим, что предварительная кратковременная адаптация дрожжей к постепенно повышающейся температуре и к повышенной концентрации соли способствует появлению приспособительных вариантов к действующему на них фактору.

В связи с этим возникает вопрос, необходимо ли действовать на дрожжи одним и тем же фактором (как при кратковременной выдержке их, так и при последующем высеве на плотные среды) или же в дрожжах происходят такие физиологические изменения, которые де-

Таблица 10

Количество дрожжевых клеток при полуторачасовой выдержке их в растворе соли при постепенно повышающейся концентрации NaCl (1—2—3%)

№ опыта	Продолжительность пребывании дрожжей в растворе соли	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды в млн.
1	Первоначальное количество	2,8
	Через 60 мин.	2,73
	» 90 »	2,83
2	Первоначальное количество	3,25
	Через 60 мин.	3,30
	» 90 »	3,25
3	Первоначальное количество	3,76
	Через 60 мин.	3,67
	» 90 »	—

лают их легко приспособляющимися одновременно к различным факторам.

Если это так, то дрожжи, подвергавшиеся предварительному температурному воздействию, должны проявить свои приспособительные функции и при росте их на среде с повышенным содержанием соли. Таким образом, может быть выявлена специфичность действия того или иного фактора.

Мы исследовали данный вопрос в отношении изучаемых нами факторов и установили, что дрожжи после кратковременной температурной обработки не дали увеличенного количества колоний на солевой среде (табл. 11).

Таблица 11

№ опыта	Количество колоний	
	Среда: сусло-агар + 5% NaCl	
	Контроль	Опыт
1	19	18
2	12	9
	Среда: сусло-агар + 6% NaCl	
3	114	118
4	72	65
5	202	171

Следовательно, мы видим, что специфичность действия одного и того же фактора при получении приспособительных вариантов у дрожжей несомненна.

Выражаю искреннюю благодарность проф. А. А. Имшенецкому за ценные советы и указания при выполнении данной работы.

Выводы

1. Дрожжи, подвергнутые кратковременному воздействию повышенной температуры (90 мин.) или обработке раствором хлористого натрия, приобретают повышенную устойчивость к температурному и солевому факторам.

2. Эти изменения не связаны с отбором устойчивых клеток в процессе кратковременного нагревания или действия раствора соли.

3. При дальнейшем культивировании дрожжей на плотных средах (4 пассажа), при температуре 39—40°, дрожжи, подвергнутые предварительной температурной обработке, и в последующих поколениях размножались более энергично по сравнению с не нагревавшимися предварительно дрожжами.

Следовательно, кратковременное нагревание способствует более быстрой адаптации дрожжей к супраоптимальной температуре. В этих условиях опыта происходит отбор наиболее приспособленных клеток.

4. Исследование бродильной функции дрожжей показало, что предварительно обработанные дрожжи дают более интенсивное брожение при температуре 30—40° только в острых (кратковременных) опытах, где отсутствовало размножение дрожжей.

5. Предварительное воздействие повышенной температуры и увеличенной концентрации соли оказывает одинаковое действие как на дрожжи Saccharomyces cerevisiae, так и на Torulopsis latvica.

6. Действие изучавшихся внешних факторов было специфичным, так как кратковременная температурная обработка дрожжей не повышала их устойчивости к повышенной концентрации соли и наоборот.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 20.V.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаузе Г. Ф. Исследования по естественному отбору у простейших. 1. Приспособление Paramecium aurelia к повышению солености среды. Зоологический журн., т. 18, вып. 4, стр. 631, 1939.
2. Генкель П. А. и Колотова С. С. Сравнительный метод оценки степени солеустойчивости хлопчатника. ДАН СССР, т. 39, № 5, стр. 209, 1943.
3. Генкель П. А., Колотова С. С. и Щербаков Н. Н. Поглощение солей хлопчатником из растворов высоких концентраций. ДАН СССР, т. 42, № 1, стр. 33, 1944.
4. Имшенецкий А. А. и Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей к повышенной температуре. Микробиология, т. XIII, вып. 4, стр. 136, 1944.
5. Doudoroff M. Experiments on the adaptation of Escherichia coli to sodium chloride. J. Gen. Physiol., No. 5, 585, 1940.

ADAPTATION IN THE YEAST

L. G. Loginova

Summary

1. The yeast subjected to the short-timed influence of increased temperature (during 90 min.) or treated by natrium chloride solution become more resistant to the agents applied.

2. The changes in question are not connected with selection of the more resistant cells during the heating or action of the salt solution.

3. The yeast that had been previously treated by the increased temperature showed the higher rate of multiplication in the subsequent generations when cultivated on the solid medium (4 passages) under 39 — 40° C as compared to untreated control. Therefore the short-timed heating of the yeast leads to the more rapid adaptation of them to supraoptimal temperature. In these conditions the selection of the cells most fitted to increased temperature took place.

4. Investigation of fermentation ability of the yeast previously treated by the increased temperature showed them to give the more intensive fermentation under 39 — 40° C only in the short-timed experiments in which the multiplication of the yeast was missing.

5. It was found in the present experiments that the preliminary treatment of the yeast by the increased temperature and concentration of the salt used showed the similar effect both on Saccharomyces cerevisiae and Torulopsis latvica.

6. The action of the agents under consideration was the specific one because the temperature treatment of the yeast did not increase their resistance to the increased salt concentration and *vice versa.*

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

О ДРОЖЖАХ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ХЕРЕСНОЙ ПЛЕНКИ

А. М. Фролов-Багреев и Н. Ф. Саенко

Хересная пленка, спонтанно развивающаяся на поверхности вина в неполных бочках в подвалах. Хереса была впервые исследована одним из нас в 1908 г., когда был доставлен образец солеры из Испании.

В русской и иностранной литературе того времени получение хереса связывалось с развитием Mycoderma vini, в чем можно было сомневаться.

Действительно, первые же опыты с солерой обнаружили, что ее засев в стерильное сусло вызывает алкогольное брожение со значительным накоплением спирта, причем по окончании брожения дает пленку, представляющую собой аэробную фазу бродившего микроорганизма. Выделенная чистая культура оказалась способной образовать споры, сбраживала глюкозу, сахарозу и мальтозу, не сбраживала лактозы и образовывала пленку в среде с 10% (объемными) алкоголя, при 25° С — на десятый день, с 15% (объемными) — на 40 день, а на субстратах с 16—17—18% (объемных) пленка не появлялась в течение 10 месяцев. Вместе с тем, развитие пленки на красном сусле приводило через 8—10 дней к разрушению красящих веществ.

Производственные опыты сбраживания сусла сортов Серсиаль, Альбилло и Педро-Хименес на дрожжах хереса выявили высокую сбраживающую способность этих дрожжей (17, 57 объемных %) и показали на протяжении трехлетней выдержки вин в бочках развитие хересных тонов.

В конце 1913 г. нами лично был привезен из Испании, с фирмы Домека, второй образец солеры, из которого мы выделили 10 чистых культур. Одна из них была аналогична с выделенной в 1908 г. Большинство культур сбраживало только глюкозу и сахарозу и две не дали заметного брожения ни в одном из взятых 4 сахаров. По спорам эти две культуры оказались принадлежащими к роду Hansenula (Willia saturnus и Willia anomala). Таким образом, пленка солеры представляет собой комплекс сахаромицетов, из которых часть (W. saturnus и W. anomala) обладает сильными этерифицирующими свойствами.

Так как последовавшие далее производственные опыты получения у нас вин типа хереса (Герасимов, Простосердов и др.) ставились на выделенной из солеры чистой культуре, способной и сбраживать сусло и развивать пленку, то нам казалось интересным и более близким к тому, что имеет место при получении хереса в Испании, испытать действие комплексных культур. Мы исходили из того наблюдения, что применение выделенных чистых культур пленчатых хересных дрожжей дает в винах, полученных в результате развития пленки, значительное развитие уксусного альдегида, который даже при длительной выдержке не исчезает и не приводит к развитию типичного для хереса букета. Вместе с тем, мы исходили из предположения, что одновременное участие этерифицирующих пленчатых дрожжей может в данном случае повести к преобразованию части уксусного альдегида в ацеталь, а также к накоплению летучих эфиров и тем самым способствовать более быстрому развитию характерного букета и вкуса хереса.

Эта работа была проведена под нашим руководством научными сотрудниками Т. А. Сахаровой и Л. А. Соловьевой.

В работе были изучены морфолого-физиологические свойства чистых рас хересных дрожжей, выделенных из испанской солеры, а также из аналогичных пленок Армении и Узбекистана. Все они по морфолого-физиологическим и культуральным свойствам могут быть отнесены к роду Saccharomyces.

Комбинированное действие хересных дрожжей и Hansenula (W. anomala) изучалось: 1) путем варьирования сроков подсева хересных дрожжей к виноградному суслу, на котором культивировалась Hansenula, а также 2) путем одновременного введения в виноградное сусло хересных дрожжей и Hansenula, взятых в различных количественных соотношениях.

Опыты, в которых производился подсев, дали наилучшие результаты по букету и вкусу для пастеризованного фильтрата трехсуточной куль-

туры Hansenula, сброженного на испанских хересных дрожжах. Количество обнаруженного при этом ацеталя — 120 мг/л против контроля — 73 мг/л.

Опыт одновременного введения испанской хересной расы (20 С) и Hansenula № 184 проводился в следующих соотношениях между ними: 1 : 1, 1 : 3, 1 : 10, 1 : 20, 3 : 1, 10 : 1, 20 : 1. Наибольшее количество спирта дала чистая культура испанских хересных дрожжей и комплексы с преобладанием последней. Наоборот, в комплексах с преобладанием Hansenula спирта образуется меньше, причем при преимущественном ее преобладании получаются недоброды, несмотря на довольно интенсивно протекающий процесс вытеснения Hansenula хересными дрожжами. Подсчет клеток Hansenula и хересных дрожжей в осадке полученного вина показал до 40% отмерших и в большинстве автолизированных клеток Hansenula.

Одновременно с окончанием брожения отмечалось начало образования хересной пленки, причем почкующиеся в пленке хересные дрожжи постепенно вытесняют в большинстве отмершие клетки Hansenula, которые в 45-дневной культуре пленки полностью исчезают. После снятия вина с пленки оно было приведено к обычным кондициям хереса, т. е. к 20% (объемных) алкоголя и 3% сахара, после чего для ускорения ассимиляции составных частей вино подверглось пятидневному нагреву при 50° С.

Сравнительно с контролем (чистая культура хересных дрожжей) лучшую оценку получило вино, сброженное на комплексе 10 : 1, т. е. с десятикратным преобладанием хересных дрожжей. Наиболее высокая оценка этого комплекса была отмечена и до приведения вина к кондициям с последующим нагревом.

Любопытные данные были получены с комплексом хересных испанских дрожжей 20 С и Hansenula А. Н., полученной из Института микробиологии Академии Наук и резко отличающейся по морфологическим и культуральным свойствам от Hansenula № 184. Комплекс был составлен в тех же соотношениях. В результате опыта было установлено, что Hansenula А. Н. в небольших количествах активирует брожение, а в больших его угнетает. Сам бродильный процесс во всех случаях протекает живее и заканчивается быстрее, чем в комплексах с Hansenula № 184. Наблюдается также стимулирование роста хересной пленки на вине в комплексах с преобладанием Hansenula А. Н.

В результате 20-дневной выдержки под пленкой наилучший по вкусу и аромату образец дал комплекс с преобладанием Hansenula А. Н. в отношении 1 : 10, при содержании уксусного альдегида 286 мг/л, ацеталя 101,6 мг/л и летучих эфиров 1,6 г/л против контроля — 0,2 г/л. Большое количество уксусноэтилового эфира, как показала дегустация, придает вину оригинальность и приятный фруктовый аромат, хорошо сочетающиеся с хересным тоном. При преобладании хересных дрожжей наблюдается слишком большое накопление уксусного альдегида (до 388 мг/л), а при преобладании Hansenula А. Н. возникает слишком много уксусноэтилового эфира (3,38 г/л), что и в том и другом случаях значительно снижает вкусовую оценку. Как это установлено специальной работой Н. Ф. Саенко, содержание летучих кислот при выдержке под пленкой и здесь имеет ясно проявленную тенденцию снижения, что неизменно улучшает качество вина.

Чистая культура хересных дрожжей (контроль) дала в этом опыте менее интересное вино, со слабым хересным тоном. Таким образом, хотя наш опыт применения комплекса с этерифицирующими расами, за отсутствием в доступных нам коллекциях W. saturnus, ограничился только испытанием W. anomala, мы все же пришли к выводу о целесообразности применения в хересном производстве комплекса с этерифицирующими пленчатыми расами. Мы не сомневаемся, что фактор удли-

нения времени выдержки готовых хересованных материалов, отсутствовавший в наших опытах, может только улучшить дальнейшее развитие букета и еще более приблизить получаемые вина хереса к прототипу.

Вместе с тем, нами были испытаны комплексы с одновременным введением в виноградное сусло испанских и армянских, а также испанских и узбекских хересных дрожжей. В первом случае испанские хересные дрожжи 20 С обладали лучшей бродильной способностью сравнительно с расой «Эривань 59», и поэтому представлялось интересным испытать их совместную работу. Это испытание показало, что указанное комбинирование способствует более быстрому и полному выбраживанию вина, а также ускоряет развитие хересной пленки, что важно для производства. Во вкусовом отношении купажи, сброженные на комплексных культурах, оценены выше, чем контрольный, сброженный на чистой культуре херес 20 С.

Во втором случае изучение комплекса испанских и узбекских хересных дрожжей, наоборот, было интересно в смысле усиления бродильной энергии испанских дрожжей, так как они оказались слабее в отношении накопления алкоголя, чем узбекские дрожжи. Комбинирование их оправдало поставленную цель — значительно сократить период сбраживания. Хересная пленка появляется одновременно с окончанием брожения. Наилучшая проба по аромату и вкусу, а также по приближению к типу хереса была получена при соотношении испанских хересных дрожжей к узбекским, как 10 : 1.

В целом, проделанная работа еще лишний раз показывает, что брожение на комплексах представляет собой одну из интереснейших проблем технической микробиологии. Правильно подобранный бродильный комплекс, с нашей точки зрения, является гибким орудием для установления в отбродившей среде желаемого химического состава, обеспечивающего развитие тех или других оттенков букета и вкуса.

Выводы

1. Испанская хересная пленка (солера) представляет собой комплекс сахаромицетов, из которых часть является сильными бродителями, дающими по окончании брожения пленку, другая часть Hansenula, наоборот, не способна к брожению, но обладает в аэробной фазе этерифицирующими свойствами.

2. При сбраживании вин на чистых культурах, выделенных из солеры, возникающие пленки ведут к накоплению ацетальдегида, который давая тон хереса, не приводит, однако, к вкусовой гармонии и развитию типичного букета.

3. Опыты по подсеву хересных дрожжей к трехсуточному фильтрату из-под культуры Hansenula дали помимо хересного типа развития букета в связи с более значительным образованием ацеталя.

4. Опыт с одновременным введением хересной расы и Hansenula 184 показали, что при преобладании последней бродильные свойства хересных дрожжей ослабляются, а возникающая пленка Hansenula № 184 постепенно вытесняется ими. Наилучшие результаты по букету и вкусу получены в комплексе с десятикратным преобладанием хересных дрожжей.

5. Испытание комплекса хересной расы и Hansenula А. Н. (получена из Института микробиологии Академии Наук) обнаруживает стимулирование брожения и роста пленки и при небольших и при преобладающих дозировках Hansenula А. Н. В вине при 20-дневной выдержке под комплексной пленкой (1 : 10) обнаружены, помимо альдегида, значительные количества уксусноэтилового эфира и ацеталя давших вину гармоничное сочетание хересного и фруктового тона.

6. Комплексы испанской хересной расы с узбекскими хересными

дрожжами, а также с армянскими в свою очередь показали целесообразность их применения на практике.

7. Проблема брожения на комплексах в хересном производстве, как вероятно и вообще в виноделии и иных отраслях бродильной промышленности, представляет глубокий интерес как открывающая возможность влиять в желаемом направлении на химический состав и органолептические свойства продукта.

Получено 14.VI.1945

Московская центральная
научно-исследовательская лаборатория
по виноделию

THE YEAST ISOLATED FROM THE SHERRY FILM

A. M. Frolov-Bagreev and *N. F. Saenko*

Summary

1. Spanish sherry film (solera) is the complex of Saccharomycetes the part of which possesses the strong fermentating ability forming the film after fermentation while the other part of Hansenula are not able to fermentation but possesses the etherising peculiarities in the aerobic phase.

2. When the fermentation of wines with the pure cultures isolated from solera takes place the films arised lead to accumulation of acetaldehyd, which giving the sherry taste does not show, however, the taste harmony and typical bouquet.

3. The experiments on inoculation of 3-days filtrate of Hansenula culture by the sherry yeast showed in addition to the sherry type, the presence of bouquet in connection with the more considerable formation of acetal.

4. The experiments on the simultaneous introducing of the sherry race and Hansenula 184 showed the predominance of the latter race and decreasing of fermantation ability of the sherry yeast. The film produced by Hansenula is gradually replaced by the sherry yeast. The best results in relation to bouquet and taste were obtained in the complex in which the content of the sherry yeast was ten times as much as the other constituent.

5. Test of the complex consisted of the sherry race and Hansenula AN (received from the Academy of Science) showed the stimulation of fermentation and growth of the film when the excess of Hansenula AN race was insignificant as well as the predominant one. After 20-days keeping of the wine under the comp'ex film (1 : 10), in addition to aldehyde, there was found the considerable amount of acetic-ethyl ether and acethyl, which conditioned the harmonious combination of the sherry and fruit tone of the wine.

6. The test of the comp'exes of the sherry race with uzbek sherry and armenian yeasts also showed expedience of their use in practice.

7. Fermentation on the comp'exes in the sherry production as well as in the wine-growing and in the other branches of fermentation industry in general is of very interest giving the possibility to influence upon the chemical composition and organoleptic peculiarities of products in the desirable direction.

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ МАСЛЯНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

А. А. Имшенецкий и *Л. И. Солнцева*

С маслянокислыми бактериями в истории микробиологии связано два этапа. Они были открыты Пастером [4] в тот период, когда его современники оспаривали возможность жизни без свободного кислорода и понятие анаэробиоза вызывало возражения со стороны выдающихся ученых того времени. Существование строго анаэробных маслянокислых бактерий решило окончательно спор в пользу Пастера.

Через 34 года наш соотечественник Виноградский доказал, что маслянокислые бактерии фиксируют атмосферный азот, и тем самым открыл новую страницу в истории науки. Как известно, преемственность его исследований с работами Пастера нашла себе отражение в названии, которое дал Виноградский [1] изучавшейся им бактерии — Clostridium Pasteurianum.

В дальнейшем оказалось, что маслянокислые бактерии и родственные им организмы относятся к наиболее распространенным в природе анаэробным видам и играют большую роль в круговороте углерода и азота. Чем шире распространен микроорганизм, тем больше шансов обнаружить варианты, адаптированные к различным условиям жизни. Теоретически должны существовать галофильные, термофильные и другие маслянокислые бактерии. Наши систематические поиски микроорганизмов, вызывающих различные процессы при высоких температурах, позволили изолировать ряд форм (Имшенецкий, [2]). В дальнейшем было продолжено выделение и изучение анаэробных термофилов, в первую очередь относящихся к группе маслянокислых бактерий. В этом сообщении изложены принципы тех методов, с помощью которых производились поиски анаэробов, а также описаны изолированные культуры.

Выделение анаэробных термофилов

Интересно, что Пастер никогда не стремился, как некоторые из его современников, найти универсальную для всех микроорганизмов питательную среду. Он учитывал обычно естественные условия обитания микроба: в частности, проводя свои исследования с куриной холерой, он применял для выращивания бактерий куриный бульон. В этом простом методическом приеме уже имелись зачатки того направления в микробиологии, которое развилось только в последнее время. Мы подразумеваем экологическую микробиологию, располагающую большим числом, к сожалению, еще не обобщенных наблюдений.

При разработке методов выделения анаэробных термофильных бактерий оказалось, что в этих исследованиях необходимо исходить из экологии организмов. Не останавливаясь на описании отдельных опытов, резюмируем их результаты в виде отдельных положений.

1. В почве и других субстратах сравнительно редко встречаются термофильные анаэробные бактерии, сбраживающие углеводы при 55°. Поэтому выделение термофильных форм целесообразно производить из мест, постоянно имеющих высокую температуру, например из термофильных метантэнков. В последних содержатся различные растительные остатки, сбраживаемые в анаэробных условиях при высоких темпе-

ратурах. Повидимому, при постепенном подъеме температуры, происходящем при переводе мезофильного брожения осадка сточных вод на термофильное, сравнительно быстро селекционируются термофилы, которые становятся затем доминирующей микрофлорой в метантэнке.

2. Изучение биологии термофильных бактерий выяснило, что в природе доминируют не термофильные, а термотолерантные формы (Имшенецкий [2]). Это полностью распространяется и на анаэробных термофилов, сбраживающих углеводы. В разлагающемся растительном сырье, почве, пищевых продуктах и т. п. довольно часто встречаются термотолерантные анаэробные бактерии. Они способны расти не только при 55—60°, но и при относительно низких температурах. Однако эти культуры вырождаются во время пассажей при 55—60°. Следовательно, эти температуры для них максимальные, а не оптимальные и приводят закономерно к гибели.

3. При выделении термофилов из источников, имеющих высокую температуру, например термофильных метантэнков, необходимо строго придерживаться той температуры, при которой микробы существуют в метантэнке. Если бактерии функционируют длительное время при 50—52°, а культивирование их в лаборатории будет производиться при 60°, то это вызовет дегенерацию и последующее отмирание культуры.

4. Благодаря относительной «пластичности» микробов они, сравнительно легко адаптируясь к условиям внешней среды, дают довольно характерные экотипы. Иногда физиология питания при этом настолько меняется, что их нормальное развитие становится возможным только при воспроизведении полностью в лаборатории условий, обычных для микроба. В частности, анаэробные термофилы, изолированные из термофильного метантэнка, плохо, а иногда и совсем не растут на обычных питательных средах и дают хороший рост на субстратах, приготовленных на фильтрате осадка сточных вод.

В результате адаптации к окружающей среде у одного и того же вида могут возникнуть экотипы, резко отличающиеся по своей физиологии. Так, например, существование в природе анаэробных азотфиксирующих бактерий на среде, богатой белковым азотом, может привести к образованию экотипа, утратившего способность развиваться на безазотистых средах. Отсюда следует, что, выделяя термофильные маслянокислые бактерии, сбраживающие углеводы, не всегда можно получать вариант, фиксирующий азот.

Характеристика маслянокислых термофильных бактерий

Осадок сточных вод, взятый из термофильного метантэнка, работавшего при 55°, был посеян в налитый высоким слоем в пробирки и расплавленный картофельный агар (состав среды: картофеля 20%, фильтрата сточных вод 100%, мела 2%). На этой среде, из различных проб осадка, было выделено 3 штамма маслянокислых бактерий. Так как они оказались одинаковыми, ниже приводится описание одного из них.

Морфология. Молодые вегетативные клетки палочковидной формы с закругленными концами 1 $\mu \times 3{,}5$—$5{,}0$ μ величины. Клетки располагаются одиночно, реже парно, или короткими цепочками из 4 члеников (рис. 1). Палочки оживленно подвижны, но уже в 17-часовых культурах в связи с началом процесса образования спор подвижность утрачивается. При спорообразовании клетки приобретают типичную клостридиальную форму. Споры овальной формы и располагаются в клетке субтерминально. Размер спор $1{,}3$ $\mu \times 1{,}7$ μ. Прорастают споры полярно. В начальных стадиях спорообразования в клетке появляются зерна гранулезы, позднее все содержимое клетки, имеющей на конце спору, окрашивается иодом в черно-синий цвет и клетки приобретают характерный для маслянокислых бактерий вид (рис. 2). Окраска по

Граму дает непостоянные результаты, но такая грамлабильность не связана с возрастом клеток.

Рост на средах. На мясопептонном агаре и бульоне бактерия не развивается. Нет также роста в анаэробных условиях на сусле, сусло-агаре, молоке и кусочках картофеля. Хороший рост на картофельном агаре, приготовленном на фильтрате осадка сточных вод. На картофельной желатине с тем же фильтратом бактерия растет, но желатина не разжижается. На поверхности мясопептонного агара с глюкозой и фильтратом, в анаэробных условиях, вырастают круглые, серовато-желтые, прозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровными краями. Размер колоний достигает 0,8 мм.

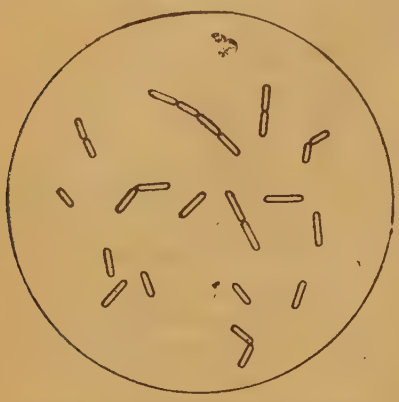


Рис. 1. Термофильный вариант Cl. Pasteurianum. Молодые вегетативные клетки в 5-часовой культуре 2000 ×

Рис. 2. Термофильные маслянокислые бактерии. Типичные клостридиальные формы. Проспора темноокрашенная. Споры бесцветные. Возраст культуры 15 часов. 2000 ×

Физиология. Изолированная бактерия сбраживает: глюкозу, левулезу, галактозу, декстрин с образованием углекислого газа и водорода. Нет совершенно брожения на средах с сахарозой, мальтозой, лактозой, рафинозой, арабинозой, крахмалом, маннитом, глицерином, инулином, целлюлозой. Бактерии также не сбраживают пектиновых веществ, содержащихся в стеблях льна. Интенсивное брожение наблюдалось на картофельной среде (20% нарезанного кусочками картофеля и фильтрат).

Отношение к кислороду. Культура анаэробная и при посеве в толщу агара («столбиком») растет, только отступя 1,5—2 см от уровня агара. Однако в жидких средах возможен рост и в сравнительно невысоком слое жидкости (4—5 см).

Отношение к температуре. Оптимум роста при 53—55°. При 37° рост замедленный и при 27° роста вообще нет. Споры выдерживают 100° в течение 30 мин., но нагревание в течение такого же срока при 112° их убивает полностью.

Продукты брожения. Изолированные бактерии, сбраживая картофельные среды, образуют масляную, уксусную и следы муравьиной кислоты. Ацетон в виде следов. Бактерия обладает активной амилазой и быстро гидролизует крахмал, поэтому в культуре обнаруживается много редуцирующих веществ.

Систематическое положение. Ряд признаков говорит о том, что выделенный организм относится к маслянокислым бактериям. Сопоставим его свойства с мезофильной бактерией Clostridium Pasteurianum, описанной Виноградским.

Образование типичных клостридиальных форм, дающих гранулезную реакцию и накопление в культуре масляной и уксусной кислот, как

Таблица

Маслянокислая бактерия Clostridium Pasteurianum

Вариант	Термофильный	Мезофильный
Источник	Метангэнк	Почва
Размер клеток	Палочки 1 μ × 3,5 μ	Палочки 1,2—1,3 μ × 1,5—2,0 μ
Форма клеток при спорообразовании	Клостридиальная, вся клетка дает положительную реакцию на гранулезу. Спора на конце клетки	Клостридиальная, в клетке гранулеза. Спора на конце клетки
Подвижность	Подвижная	Подвижная
Температурный оптимум	50—60°	20—25°
Рост на мясопептонном бульоне	Нет роста	Слабый рост
Картофель (кусочек)	Нет роста	Рост
Сбраживаемые углеводы	Глюкоза, левулеза, галактоза, декстрин	Глюкоза, левулеза, галактоза, сахароза, инулин, декстрин
Продукты брожения	Масляная, уксусная, следы муравьиной кислоты	Масляная, уксусная, следы молочной, этиловый, *N*-пропиловый, *N*-бутиловый и изобутиловый спирт

основных продуктов брожения, позволяет считать изолированную бактерию термофильным вариантом мезофильного вида, описанного Виноградским как Clostridium Pasteurianum. Термофильная форма не сбраживала в отличие от мезофильной сахарозы и инулина. Нужно сказать, что вопрос об отношении маслянокислых бактерий к различным углеводам нуждается в выяснении. Достаточно указать, что Омелянский, изучая способность Clostridium Pasteurianum сбраживать сахара и спирты, пришел к другим выводам, чем Виноградский. Неясным остается также, почему маслянокислые бактерии не сбраживают чистого крахмала, добавленного к дрожжевой воде, в то время как они обладают способностью вырабатывать амилазу. Возможно, что новые данные об адаптивных ферментах позволят выяснить эти моменты.

В дальнейшем были произведены посевы термофильной маслянокислой бактерии на безазотистую среду Виноградского, применявшуюся им при изучении азотфиксирующей способности у Clostridium Pasteurianum. При этом оказалось, что термофильный вариант на этой среде не развивается совершенно. Состав среды был изменен — к ней добавлялись различные экстракты и вещества. Это были следующие среды:

1. Среда Виноградского 100,0 см³ дрожжевой воды 0,5 см³.
2. То же 100,0 см³ 2% отвара ячменных ростков 0,5 см³.
3. То же 100,0 см³ печеночного отвара 0,5 см³.

Применялся также следующий методический прием. В среду Виноградского производился предварительно посев Bact. coli или аэробной спороносной палочки, выделенной из термофильного метантэнка. Посев выдерживался соответственно при 35 и 55°. Через сутки в эту же среду засевались термофильные маслянокислые бактерии. Культивирование на этих субстратах производилось в анаэробных и, параллельно, в аэробных условиях.

Однако ни на одной из этих сред анаэробные термофилы не дали роста. Эти результаты могут быть объяснены тем, что термофильный Clostridium Pasteurianum был изолирован из осадка сточных вод, т. е. среды, исключительно богатой белками и продуктами их распада. По-

видимому, обильное азотистое питание привело к тому, что столь характерная для маслянокислых бактерий способность связывать атмосферный азот была утрачена полностью и бактерии уже не могли размножаться на средах, лишенных азота. Возможность получения неактивных форм у азотобактера путем пассирования его на азотсодержащих средах доказана экспериментально (Омелянский, Рубенчик [3]). Нужно думать, что эти опыты воспроизводили процесс, который может быть также и в природных условиях. Во всяком случае нами впервые выделен неактивный в смысле азотфиксации термофильный Clostridium Pasteurianum, и это обстоятельство лишний раз подчеркивает бо́льшую устойчивость морфологических, чем физиологических признаков. Не исключена возможность, что вариант маслянокислых бактерий, утративший способность к азотфиксации, встречается в природе чаще, так как сам метод элективной безазотистой среды, примененный Виноградским, исключает возможность выделения таких форм.

Благодаря исключительно быстрому размножению бактерий необычайно облегчается отбор, а следовательно и процесс их приспособления к различным внешним условиям. В результате в мире микробов возникают осмофильные, ацидофильные, термофильные, галофильные и другие микроорганизмы. Экологическая физиология микробов хорошо знает особенности биологии таких организмов, пределы устойчивости их к различным факторам, распространение в природе и т. д. Гораздо менее ясен вопрос об их систематическом положении, так как в микробиологии нередко видовые названия даются, исходя из экологических особенностей микроба. Этим объясняется существование, например, таких видов, как Thermobacterium, Bacillus thermoalimentophilus, Saccharomyces thermantitonum и т. п. Можно ли, основываясь на приспособлении микроба к определенным условиям среды, описывать новый вид? На этот вопрос можно ответить только отрицательно.

Совершенно один и тот же вид может попадать в самые различные условия существования и, приспосабливаясь к ним, давать новый экотип. Нередко адаптация может протекать сразу к нескольким факторам одновременно. Возможность существования разнообразных экотипов недооценивается микробиологами, и это приводит к тому, что нередко варианты одного и того же вида, обладающего различной чувствительностью к какому-нибудь агенту, описываются как два совершенно самостоятельных вида. Так, например, галофильная десульфирующая бактерия Microspira aestuaria и пресноводная Microspira desulfuricans в действительности представляют собой экотипы одного и того же вида. Точно так же термофильные целлюлозные бактерии обладают теми же свойствами, что и мезофильные бактерии, сбраживающие целлюлозу. Приведенные в этой статье данные о маслянокислых термофилах позволяют считать, что они представляют собой только особую расу мезофильного Clostridium Pasteurianum. Следовательно, очень часто можно говорить только о параллельных формах или о различных экотипах. Это, конечно, не значит, что среди приспособленных форм не могут быть самостоятельные виды, но прежде чем их выделять, необходимо доказать, что среди уже известных видов не существует тождественных в систематическом отношении организмов.

Выводы

1. При выделении анаэробных термофильных бактерий необходимо исходить из их экологии и создавать в лаборатории соответствующие условия. Культивирование при супраоптимальных температурах, применение необычных для микроорганизмов сред и другие причины могут привести к быстрому вырождению культуры.

2. Впервые изолированы и описаны термофильные маслянокислые

бактерии, характеристика которых соответствует Clostridium Pasteurianum.

3. Изолированные маслянокислые бактерии представляют собой термофильную расу мезофильной формы. Их широкое распространение в осадке термофильного метантэнка говорит о вторичном характере термофилии.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 18 VII 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградский С. Об усвоении свободного азота атмосферы микробами Арх. биол. наук 3, 293, 1895
2. Имшенецкий А. Микробиологические процессы при высоких температурах Москва, 1944
3. Рубенчик Л. Мінлівість мікроб і бактеріофаги. 1939.
4. Pasteur L. Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et dèterminant des fermentations. C. R. Acad. Sci. Paris, 52, 344, 1861.

THERMOPHYLIC BUTYRIC-ACID BACTERIA

A. A. Imšenecki and *L. I. Solnzeva*

Summary

1. It is necessary to keep in mind the habitual ecological peculiarities of the strains where one attempt to isolate the anaerobic thermophylic bacteria under the laboratory conditions. The cultivation under the supraoptimal temperatures, the employing of unusual for given microorganisms media and many other causes may lead to the rapid degeneration of the stock.

2. It was for the first time isolated and described thermophylic butyric-acid bacteria the characteristic of which corresponds to that of Clostr. Pasteurianum.

3. The butyric-acid bacteria isolated is the thermophylic variety of mesophylic form. Their wide distribution in the sediment of thermophylic metantank shows their secondary character of thermophyly.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ЗАВИСИМОСТЬ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ (B. DELBRÜCKII) ОТ ВОЗРАСТА КУЛЬТУРЫ

З. А. Канунникова

Имеется много работ, указывающих на морфологические и физиологические различия между клетками в молодой и старой культуре. Этот вопрос был специально исследован Henrici [4] в 1928 г. В 1939 г. работы по тому же вопросу были собраны Winslow и Walker [8].

Указанные возрастные изменения клеток вызываются накоплением продуктов жизнедеятельности или истощением субстрата. Возрастное состояние посевного материала сказывается также при пересевах на свежие питательные среды. Müller [7] еще в 1895 г. показал, какое значение имеет возраст материнской культуры. При пересевах из материнской культуры, находящейся в начальной стационарной фазе, фазе замедленного размножения или в фазе логарифмического размножения, отсевы начинают свое развитие с той же фазы, которую они проходили в материнской культуре. Если же пересев был произведен в одну из более поздних фаз, когда размножение клеток приостанавливается и начинается их отмирание, то во всех случаях отсеянные бактерии начинали свое развитие со стационарной фазы. Этот факт был очень хорошо показан в работе Chesney [3] в 1916 г. В ряде других работ также было установлено, что возраст материнской культуры оказывает сильное влияние на скорость размножения бактерий в отсевах в течение 1—2 генераций. Но дальше устанавливается нормальная скорость размножения, и на окончательном результате процесса развития и брожения возраст материнской культуры не сказывается.

Однако это последнее обстоятельство не всегда имеет место. Работая с B. Delbrückii, применяемой для производства молочной кислоты, мы заметили, что состояние материнской культуры (инокулята) может оказать заметное влияние не только на скорость развития дочерней культуры, но и на образование основного продукта — молочной кислоты.

Настоящая работа проведена с целью уточнения данного вопроса.

Опыты производились с одним из выделенных нами во Фрунзе в 1942 г. штаммов B. Delbrückii. Питательной средой служили: 1) 10% раствор сахарозы с 3% солодовых ростков (в качестве источника азота и ростовых веществ) и 0,1% фосфатов (0,05% KH_2PO_4 + 0,05% K_2HPO_4). 2) Меласса с 3% солодовых ростков.

Температура опытов 47—49° С. В процессе развития культуры периодически брались пробы для подсчета количества клеток в камере Тома и производились наблюдения над изменением морфологии клеток: величины, формы и отношения к окраске. Опыты велись в кислой среде и с мелом. Одновременно во взятых пробах определялась кислотность (в опытах без мела) и лактат в опытах с мелом.

Кислотность определялась титрованием 10 $см^3$ бражки 0,1 *N* щелочью в присутствии фенол-фталеина (градусы). Определение лактата велось по методу Либермана [2].

Сущность метода заключается в том, что к раствору кальциевых солей добавляется избыток соды. Сода осаждает растворенный кальций

в виде мела, который удаляется фильтрованием. К фильтрату прибавляется серная кислота в количестве, эквивалентном количеству взятой соды. Серная кислота нейтрализует оставшийся избыток соды. Избыток непрореагировавшей кислоты оттитровывается 0,1 *N* щелочью. Этот избыток эквивалентен содержанию кальциевых солей.

Данный метод не является специфическим для лактата Са и показывает общее количество органических кислот. Его преимущество заключается в простоте и быстроте выполнения.

Чтобы проследить влияние возраста материнской культуры на рост и бродильную активность отсеянных бактерий, производились отсевы в колбы с той же питательной средой. Активность отсеянных бактерий учитывалась по количеству выделенной углекислоты, образующейся в результате взаимодействия между мелом и молочной кислотой, и по количеству образовавшегося лактата. Выделенная углекислота определялась взвешиванием бродильных колбочек, снабженных затворами с серной кислотой для поглощения влаги. В отсевах также определялось число клеток и наблюдалась их морфология.

1. Характеристика развития культуры

Развитие культуры B. Delbrückii в кислой среде мы наблюдали при различной начальной кислотности и различном pH. В табл. 1 представлены данные этих опытов, из которых видно, что внесенная культура сразу начинает свое развитие. Происходит нарастание кислотности и увеличение количества бактерий. К середине вторых суток культура обычно достигает своей максимальной численности, а затем начинается постепенное уменьшение количества бактерий. Хотя наша культура B. Delbrückii не выделяет протеиназ в среду и не разжижает желатины, но автолиз бактерий подтверждается как упомянутым уменьшением их числа, так и прямыми наблюдениями под микроскопом за их морфологией.

Таблица 1

Развитие B. Delbrückii на среде с сахарозой без мела

Возраст культуры в час.	Кислотность в градусах	pH	Колич. бактерий в 1 $см^3$ в 10^6	Средняя длина бактерий μ	Возраст культуры в час.	Кислотность в градусах	pH	Колич. бактерий в 1 $см^3$ в 10^6	Средняя длина бактерии
0	3,36	5,2	55,4	2,75	0	1,4	6,8	46	2, 7
4	3,64	4,36	73,5	2,76	3	2,2	6,4	52	2, 6
7	4,48	3,9	105,6	3,00	10	4,2	5,6	544	3, 3
10	6,2	3,6	720	4,25	23	1,0	4,3	660	3, 9
22	9,8	3,29	880	3,83	36	10,2	3,5	768	4, 5
28	9,8	3,29	908	3,62	50	11,5	3,4	656	3, 4
31	9,8	3,29	568	3,59	72	12,9	3,4	584	2, 9
46	10	3,30	560	3,08	96	12,9	3,4	580	2, 8
50	10,2	3,30	556	3,17	120	12,9	3,4	528	2, 8
68	10,2	3,30	448,8	2,95					
75	10,28	3,34	380	2,54					

Из предыдущих работ с B. Delbrückii нами [1] было установлено, что pH равное 7 и выше явно замедляет развитие культуры: верхней границей оптимальной зоны следует считать pH между 6 и 7. Для низких значений pH было установлено, что при искусственном снижении pH до 3 и ниже брожение практически прекращается и кислотообразование идет в 50 раз медленнее, чем при оптимальном pH = = 5,4—5,6. Полученные теперь данные подтвердили эту зависимость (см. табл. 1). Обычно в наших опытах развитие бактерий и брожение останавливалось при pH =3,5—3,6. Чем выше была начальная кислот-

ность среды, тем меньше накапливалось кислоты, так как упомянутый pH быстрее достигался. Тот факт, что при одном и том же значении pH титруемая кислотность в разных опытах была различной, следует объяснить различной буферностью исходной среды, зависящей от степени ее нейтрализации.

В табл. 2 сопоставлены данные по развитию B. Delbrückii на сахарозе и на мелассе. На последней среде максимальное количество бактерий почти то же самое, но отмирание их начинается значительно позже. Общее количество кислоты достигает 19,4°, в то время как на сахарозе кислотность не превышала 12,6°.

Таблица 2

Брожение в основной культуре и в отсевах

На среде с сахарозой без мела			В отсевах		На мелассе без мела			В отсевах	
Возраст культуры в час.	Кислотность в градусах	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Колич. CO_2 в г за 48 час.	Лактат в %	Возраст культуры в час.	Кислотность в градусах	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Колич. CO_2 в г	Лактат в %
5	2,8	222	—	—	0	0,95	17	—	—
8	3,36	532	10,3	9,2	3	3,25	73	—	—
13	4,76	546	—	—	8	6,69	572	18,7	8,4
26	7,84	896	7,6	9,14	23	11,08	944	15,0	8,4
32	8,54	1076	5,4	9,0	32	13,0	1072	—	—
53	11,9	576	—	—	46	14,1	1128	6,5	8,1
128	12,2	492	—	—	72	17,9	1084	3,4	6,1
148	12,6	452	3,4	4,6	238	19,4	864	2,6	2,9

Все это объясняется высокой буферностью мелассы. Буферность можно увеличить еще больше путем добавления мела, благодаря чему рост культуры на такой среде достигает более высокого предела, хотя и позднее, чем в кислой среде (табл. 3). После максимума количество бактерий начинает уменьшаться благодаря отмиранию клеток и их автолизу.

Таблица 3

Брожение в основной культуре и в отсевах

На среде с сахарозой с мелом		В отсевах		На мелассе с мелом		В отсевах	
Возраст культуры в час	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Колич. CO_2 в г за 48 час.	Лактат в %	Возраст культуры в час.	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Колич. CO_2 в г за 48 час.	Лактат в %
5	222	—	—	0	17	—	—
8	736	9,2	9,2	3	523	—	—
13	1 384	—	—	8	700	6	8,3
26	2 168	11,5	9,8	23	844	11,6	8,3
32	1 372	10,7	9,8	32	1 588	—	—
53	746	—	—	46	1 984	—	—
128	728	—	—	72	1 432	7,3	8,2
148	693	6,0	8,0	238	1 272	5,3	5,3

Наблюдения над морфологической картиной культуры в процессе развития показали, что обычно в начале своего развития бактерии уменьшаются в размере, а затем начинают увеличиваться и достигают наибольшей своей величины в тот момент, когда культура достигла своего максимального числа (от 2,7—2,9 μ до 3,5—4,5 μ), после чего размер бактерий начинает снова уменьшаться (см. табл. 1).

В молодой культуре в клетках, окрашенных метиленовой синькой,

наблюдаются метахроматиновые зерна. Вначале количество таких клеток невелико (4—6%), а затем увеличивается и в суточной культуре число их доходит до 50—60%, после чего постепенно понижается.

В культуре возраста от 2 до 4 дней начинаются заметные старческие изменения клеток в виде уменьшения их размеров, появления плохо окрашенных, плазмолизированных и автолизированных бактерий.

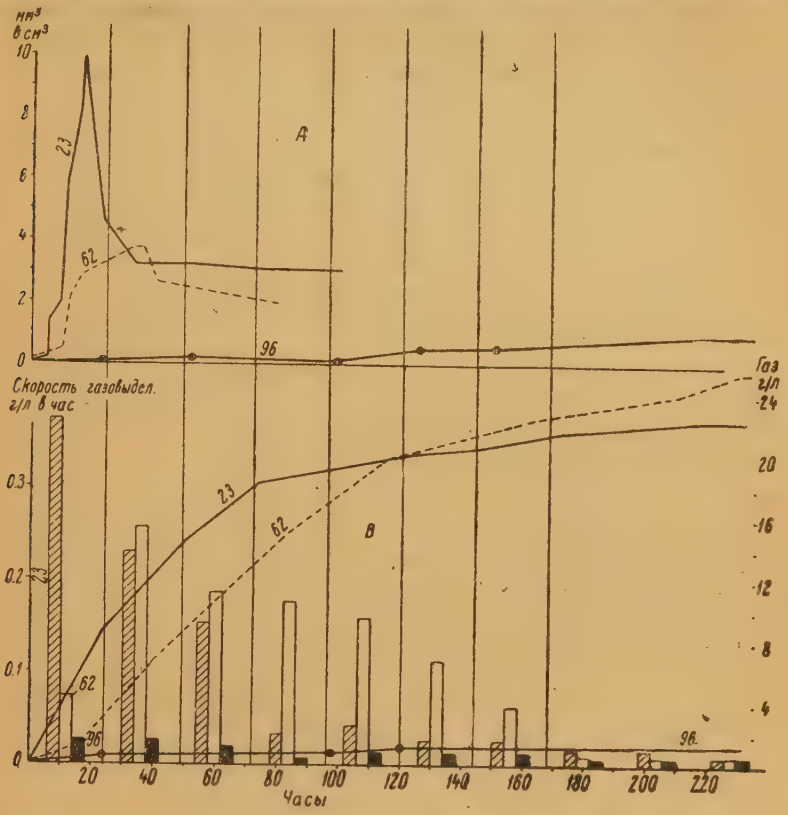


Рис. 1. Развитие B. Delbrückii в отсевах разного возраста

A. Объем бактериальной массы в мм³ на 1 см³ среды. *B*. Газовыделение. Колонки: скорость газовыделения г/л в час. Кривые: общее количество газа. Цифры обозначают возраст посевного материала

В условиях кислой среды жизненный цикл бактерий проходит быстрее, чем в среде с мелом. Раньше появляется в клетках зернистость и раньше начинается старение бактерий и их автолиз.

2. Влияние возраста почвенного материала на развитие

Как уже указывалось, в ряде опытов изучалось влияние возраста материнской культуры на рост и бродильную способность отсеянных бактерий. Рис. 1 показывает, что между количеством бактерий и скоростью их размножения, с одной стороны, и скоростью брожения, с другой стороны, существует прямое соответствие. На основании этого, в дальнейшем в ряде опытов и скорость развития и активность отсеянных бактерий учитывались только по количеству выделяемой углекислоты.

Серия проведенных опытов показывает, что возрастное состояние основной культуры заметно отражается на жизнедеятельности бактерий в отсевах. При отсеве (см. табл. 2 и рис. 2) из культуры в период ее интенсивного размножения (отсев из 8-часовой культуры) получается энергичное брожение. Но уже отсевы из 23- и 26-часовой культуры,

рост которой приостанавливается, показывают некоторое замедление в развитии. Еще большая задержка развития наблюдается при отсевах на вторые сутки (32 и 46 час.), хотя и здесь в конце концов достигается нормальный выход лактата.

В отсевах, сделанных в еще более поздние сроки (148, 238 час.), не только начальная фаза задержанного роста удлиняется, но и происходит снижение количества продуктов брожения. Повидимому, бактерии из фазы отмирания оказываются неспособными к полному омоложению и на свежей среде к исходной жизненной активности уже не возвращаются.

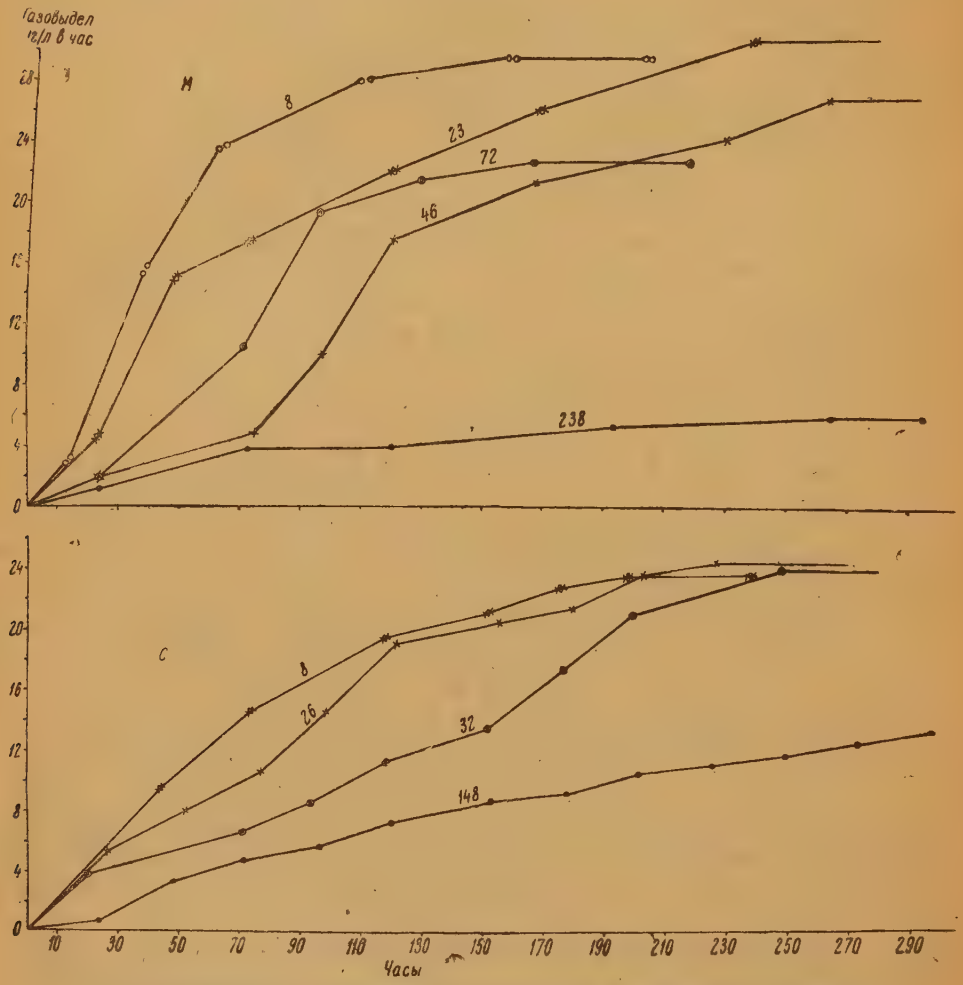


Рис. 2. Брожение в отсевах из культуры без мела разного возраста
M — меласса, *C* — среда с сахарозой. Цифры обозначают возраст посевного материала

Такого же характера, но слабее выраженную зависимость бродильной способности отсеянных бактерий от возраста основной культуры можно наблюдать и в тех случаях, где основная культура выращивалась с мелом (рис. 3).

Hershey [5, 6], работая с культурой B. coli, отмечает, что возраст исходной культуры B. coli не влияет на начальную скорость роста отсеянных клеток, если рост учитывается по изменению бактериальной массы. Возраст исходной культуры отзывается только на темпе деления клеток. Клетки, отсеянные из старой культуры, не сразу приступают к размножению и в первое время только увеличиваются в объе-

ме; благодаря этому к началу логарифмического размножения они по своим размерам значительно превосходят клетку из молодой культуры, хотя общая бактериальная масса в обоих случаях одинакова.

Учитывая эти наблюдения, мы при определении интенсивности роста культуры не ограничивались подсчетом числа клеток, но измеряли также их средние размеры и на основании этого высчитывали общий объем бактериальной массы. Измерение поперечника клеток не могло

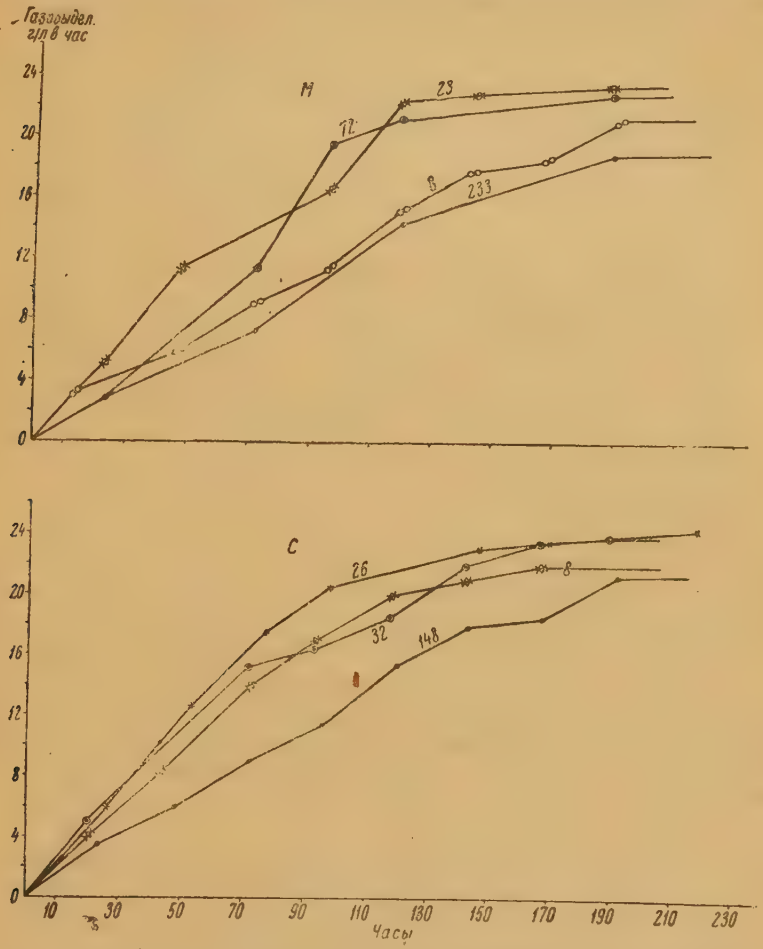


Рис. 3. Брожение в отсевах из культуры с мелом разного возраста
M **— меласса,** ***C*** **— среда с сахарозой. Цифры обозначают возраст посевного материала**

быть сделано с достаточной точностью; между тем даже небольшая ошибка в измерении толщины клеток дает значительную неправильность при вычислении объема, так как поперечник клетки возводится при этом в квадратную степень.

Ввиду этого мы сочли более точным принимать во всех случаях диаметр клетки за постоянную величину. По многочисленным промерам диаметр клетки в среднем равнялся 1 μ. Из данных на рис. 1 и табл. 4 можно видеть, что самое интенсивное накопление бактериальной массы имеют бактерии, отсеянные из основной культуры 23-часового возраста. Дальше следует кривая бактерий, отсеянных в возрасте 62 час. И, наконец, кривая, показывающая еле заметное накопление бактериальной массы, отображает развитие бактерий, отсеянных из основной культуры 96-часового возраста. Следовательно, в противоположность данным Hershey, в отсевах из старой культуры не только осла-

бевает темп размножения, но в еще большей степени снижается скорость прироста бактериальной массы (рис. 1), так как размеры клеток тем меньше, чем старше посевной материал (табл. 4). Разница оказалась бы еще более значительной, если бы вместо условной постоянной толщины клеток мы исходили из фактической ее величины, так как более короткие клетки вместе с тем несколько тоньше, чем длинные. Таким образом, накопление бактериальной массы так же, как и биохимическая активность бактерий, находится в зависимости от возраста исходной культуры, от ее физиологического состояния.

Таблица 4

Развитие B. Delbrückii в отсевах разного возраста

Отсев на 23-м часу			На 62-м часу			На 96-м часу		
Возраст культуры в час	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Средняя длина бактерий μ	Возраст культуры в час	Колич. бактерий в 1см³ в 10^6	Средняя длина бактерий μ	Возраст культуры в час	Колич. бактерий в 1 см³ в 10^6	Средняя длина бактерий
0	51,6	3,6	0	100	3,67	0	52	2,8
2	55,2	3,5	3	152	2,76	23	77	2,55
4	110,8	2,8	6	160	3,1	52	125,8	2,55
6	680,0	2,4	9	180	3,1	98	255	2,5
8	928	2,5	12	786	3,2	126	372	1,7
11	2 048	3,2	15	1 048	3,0	150	448	1,5
14	2 072	4,4	31	960	4,3	222	1 096	0,93
16	2 608	4,2	36	852	4,8			
23	1 044	4,8	40	760	4,05			
33	756	4,9	79	560	4,05			
51	750	4,9						
75	620	4,97						
99	580	6,1						
123	388	6,4						

Хотя морфолого-физиологические признаки бактерий в отсевах из основной культуры разного возраста явно различаются, все же следовало убедиться, что эти различия обусловлены возрастными изменениями самих клеток в стареющей культуре, а не теми продуктами метаболизма, которые вносятся вместе с посевным материалом. Для этого в питательную среду перед засевом вносилось 5% убитой 72-часовой культуры. Засев производился 0,1% культуры. В контрольные колбы убитая культура не добавлялась.

Опыты показали, что добавление 5% среды, в которой бактерии развивались в течение 72 часов, не только не мешает брожению, но даже оказывает некоторое стимулирующее действие. Обычно в наших опытах объем вносимой культуры был не больше 1%.

Таким образом, в противоположность литературным данным для кишечной палочки и других бактерий у B. Delbrückii возраст посевного материала отзывается не только на длительности начальной фазы замедленного развития, но в некоторых случаях может служить причиной серьезного снижения бродильной активности. Причины этого будут выясняться в следующей работе.

За систематическое руководство работой приношу глубокую благодарность Н. Д. Иерусалимскому.

Выводы

Наблюдения над развитием культуры B. Delbrückii показали, что бактерии в процессе своего развития претерпевают изменения как в отношении величины клеток и их старения, так и в отношении их способности к размножению и бродильной активности.

Возраст бактерий в посевном материале сказывается на развитии B. Delbrückii на свежих питательных средах.

В отсевах из культуры в период ее энергичного размножения бактерии проходят нормальный цикл развития и энергично образуют лактат.

Бактерии, отсеянные из основной культуры в период остановки размножения или вскоре после него, после начальной задержки роста все же «омолаживаются» и дают нормальное брожение. Общее количество лактата в этих условиях иногда бывает несколько уменьшенным.

Если же отсевы производить из основной культуры, находящейся в фазе гибели клеток, то отсеянные бактерии в свежей питательной среде уже не могут восстановить свою способность к нормальному росту и бродильной активности.

Специальные исследования показали, что поведение бактерий в отсевах объясняется возрастным состоянием самих клеток, а не продуктами метаболизма, которые вносятся вместе с посевным материалом.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 20 V 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский Н. Д. и Канунникова З. А. Изменчивость биохимической активности B. Delbrückii в зависимости от условий культивирования. Сборник рефератов АН СССР. 1941—1944.
2. Либерман А. Б. Производство молочной кислоты. 1933.
3. Chesney A. M. The latent period in the growth of bacteria. J. Exp. Med., 24 387, 1916.
4. Henrici A. T. Morphologic variation and the rate of growth of bacteria. C. C. Thomas Springfield, Illinois, 1928.
5. Hershey A. D. and Bronfenbrenner. Factors limiting bacterial growth. III. Cell size and physiologic youth in B. coli cultures. J. Gen. Physiol., 21, 721, 1938.
6. Hershey A. D. Factors limiting bacterial growth. IV. The age of the parent culture and the rate of growth of transplants of E. coli. J. Bact., 37, 3, 1939.
7. Müller Max. Ueber den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus-Bacillus. Z. Hygiene, 20, 245, 1895.
8. Winslow C. E. A. and Walker H. H. The earlier phases of the bacterial culture cycle Bact. Rev., 3, 147, 1939.

DEPENDENCE OF BIOCHEMICAL ACTIVITY OF THE LACTIC-ACID BACTERIA (B. DELBRÜCKII) UPON THE AGE OF CULTURE

Z. A. Kanunnikova

Summary

The observations showed that B. Delbrückii during their development undergo the changes both in relation to size of the cells and their starvation and in relation to their ability to multiplying and fermentative activity. The age of B. Delbrückii influences its growth on all the nutritive media. Inoculation made during the period of intensive multiplication causes the normal cycle of development and intensive formation of lactat.

The bacteria taken for inoculation from the original culture during or soon after the period of ending of growth were found to show some initial retardation of the growth. Then they undergone «rejuvenescence» and are normally fermentating. The whole amount of lactat in these conditions are somewhat decreased. The bacteria taken from the culture at the stage of dying off of the cells are not able to reestablish their ability to normal growth and fermentation activity.

The special investigation showed that the behaviour just described caused by the differences in age of the cells themselves but met by the products of metabolism which are introduced with inoculation material.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СЕЛЕКЦИЯ УКСУСНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Н. И. Гамова-Каюкова

Одной из основных задач бродильной микробиологии является введение в практику более совершенных рас микроорганизмов. Пастер еще в 1864 г. [9] указал пути селекции уксуснокислых бактерий. Со свойственной ему наблюдательностью он охарактеризовал производственно-ценные штаммы. «Наилучшее окисление производит тонкая суховатая пленка или еще лучше пленка, покрытая жирным блеском. При появлении слизистых пленок эфирные ароматические вещества, составляющие букет уксуса, исчезают, уксусная кислота может полностью исчезнуть». Однако Пастер имел дело с «эмпирическими культурами», случайно отобранными в производстве.

Начало сознательной селекции было положено Hansen [16, 17] выделившим впервые чистые культуры Bact. aceti, Bact. Pasteurianum и Bact. Kutzingianum.

В 1886 г. Brown [15] выделил Bact. xylinum вредителя уксусного производства, описанного еще Пастером.

Конец XIX столетия характеризуется массовым выделением новых видов и их вариететов; Henneberg [18, 19], Zeidler [29], Lindner [23], Beiyerinck [14], Seifert [25], и др.

Геннебергу обязаны выделением таких производственно ценных видов, как Bact. Schuzenbachi и Bact. curvum; с помощью последних Геннерберг на опытной установке скорого способа получает уксус крепостью до 11% и выше.

Kluyver и de Leenw [21], выделили новый вид уксуснокислых бактерий Bact. suboxydans, не образующий пленки. Vandecavey [27], получил уксус из яблок с культурой бактерий, не образующей пленки (патент). В селекции уксуснокислых бактерий этому виду, по нашему мнению, должно уделяться внимание при производстве уксуса во вращающихся генераторах.

В позднейший период выделялись и описывались разные «дикие» формы, которые если и представляли интерес для некоторых целей (получение глюконовой кислоты, сорбозы и др.), то все же не годились для приготовления уксуса. Herman [20], Kreham [22], Уткин [13], Креслинг [5].

У нас в Союзе уксусные бактерии изучались Шаинской [11], Шапошниковым [12], Мантейфель [6, 7, 8], Ротмистровым [10], Анненковым [1], а также Гамовой-Каюковой и Рович [3, 4].

Что касается чистых культур в производстве виноградного уксуса, то здесь дело обстоит хуже, чем в производстве уксуса по скорому способу, хотя уже Пастер отметил улучшение работы на удачно отобранных «эмпирических культурах». Perold [24], Steinmetz [26] считают, что применение чистых культур ускоряет процесс уксусообразования по орлеанскому методу. Мичиганская опытная станция (Wyant [28]), рекомендует чистые культуры для производства уксуса из сидра.

Подробных же обследований микрофлоры заводов, вырабатывающих винный уксус, не имеется. Рекомендуемая Геннебергом Bact. orleanense выделена из образователей скорого способа. Perold описывает 11 видов винноуксусных бактерий, выделенных из вин различных винодельческих стран. В изучаемых образцах вин различного происхождения пленка состояла из одного или нескольких видов. Есть основание полагать, что некоторые виды являются сборным понятием (Bact. aceti, Bact. rancens). Все это указывает на необходимость детального изучения и отбора культур для производства винного уксуса.

Эта работа проводилась нами с 1938 г. по 1941 г. во Всесоюзной научно-исследовательской лаборатории уксуснокислого брожения и Всесоюзном научно-исследовательском институте консервной промышленности, продолжена во время войны в Центральной санитарно-гигиенической лаборатории г. Москвы.

Не имея на сегодняшний день теоретических предпосылок в деле селекции уксуснокислых бактерий для производства различных сортов уксуса, мы руководствовались при подборе отдельных культур и составлении их комбинации следующими признаками: 1. Сильно выраженной окислительной способностью и быстротой окисления. 2. Хоро-

шим вкусом и букетом уксуса. 3. Отсутствием переокисления при 6—8% кислоты. 4. Устойчивостью к кислоте. 5. Ростом в широких температурных границах. 6. Стойкостью первоначальных признаков. Кроме того: для орлеанского и пастеровского методов пленка должна быть прочной и обязательна устойчивость к спирту; для скорого способа — рыхлая пленка, не обязательна устойчивость к спирту > 4—5%.

Методика исследования

Выделение производилось из различных объектов (уксус, стружки, плоды и ягоды) путем посева на сусловый агар и методом элективных сред (вино с 6—14% спирта, сусло 6° Блг. с 1—3% уксусной кислоты и 3—4% спирта). Из элективных культур производился высев на сусловый агар в чашки Петри с мелом и без него. Отдельные колонии высевались в колбочки с 4% спирта или сухое вино крепостью 10—14%. Морфологически однородные культуры пересевались вновь на чашки Петри и выделялись на косой сусловый агар. Окислительная способность проверялась в колбах Виноградского или Эрленмейера емкостью от 100 мл до 3 литров на стружках и без стружек. При изучении максимальной кислотности в культуре с суслом добавление спирта производилось периодически по мере его переработки, посредством стеклянной трубки, опущенной через ватную пробку на дно колбы, чтобы не повредить пленки. Чистые культуры сохранялись в коллекции: на сусловом агаре и, кроме того, бактерии скорого способа на среде Геннеберга без картофельной патоки + 4% спирта и сусле 6° Блг. + + 4% спирта: винноуксусные на вине с 10—14% спирта и на сусле + + 4% спирта. Отношение к углеводам изучалось на среде Геннеберга без крахмальной патоки (фосфорнокислого аммония 0,1%, фосфорнокислого калия 0,1%, сернокислого магния 0,1%). 10% раствор углеводов стерилизовался дробно и добавлялся стерильно в количестве 1 мл на 10 мл среды. Засев производился пленкой 48 час. культуры. Определение кислотности производилось титрованием 0,1 *N* раствором NaOH в 10 мл среды через 10 дней. Отобранные культуры испытывались на полузаводских установках и аппаратах заводского типа (в бочках по орлеанскому методу, в пастеровских чанах, во вращающихся генераторах и аппаратах Шюценбаха).

Выделение и селекция производственных штаммов уксуснокислых бактерий

Всего из различных природных источников, образцов уксуса и уксусообразователей выделено около 100 штаммов.

Выше указывалось, что в вопросе селекции уксуснокислых бактерий не имеется такого большого опыта, как в родственных областях. Нет также работ и по изучению экологии уксуснокислых бактерий. Круговорот уксуснокислых бактерий неизвестен. По аналогии с дрожжами (быстрая гибель на поверхности ягод винограда, почти полное отсутствие на здоровых ягодах) можно было думать, что они не относятся к нормальной эпифитной микрофлоре, а переносятся насекомыми (плодовая мушка и др.). Действительно, при выделении из природных условий с поверхности плодов и ягод из 16 образцов уксуснокислые бактерии были выделены в 7 случаях. Из 9 образцов яблок, груш, слив, винограда, вишен и абрикосов уксуснокислые бактерии не удалось выделить.

Ввиду того, что из природных условий ценные для производства виды выделялись только в редких случаях (табл. 1), мы считали целесообразным произвести выделение их из различных виноградных уксусов.

Таблица 1

Уксуснокислые бактерии с поверхности плодов и ягод

Образцы	Вид	Максимальная кислотность в %
Изюм № 1	Bact. aceti	8—9
» № 2	Bact. ascendeus	3
Виноград № 1	Bacr. xylinum	4,5
» № 2	» aceti	7,8
Слива	» »	7,3
Клюква	» »	4,4
Финики	Bact. ascendeus	5,5

В нашем распоряжении имелись образцы виноградного уксуса Треста совхозов Наркомзема (Тбилиси), полученные разновременно, и 7 образцов из колхозов Восточной и Западной Грузии, собранные М. Г. Галашвили, сотрудником Санитарно-гигиенического института в Тбилиси.

Из 3 образцов уксуса Треста совхозов Наркомзема с исходной кислотностью 4—5, 2% выделены Bact. xylinoides и Bact. xylinum.

Из 7 образцов кустарных производств Bact. xylinoides, Bact. xylinum были выделены только из 2 образцов. Из 5 образцов выделены: Bact. ascendens Bact. aceti и 5 штаммов слабокислотных, но ароматообразующих бактерий, не описанных в литературе: штаммы 31, 34, 35, 36, 37, идентичные между собой. Это неподвижные, грамотрицательные коккобациллы размером 0,8—0,6 × 0,6 μ окрашиваются иодом в желтый цвет. Пленка сухая, точечная, непохожая на пленки описанных видов. При длительном культивировании на вине, содержащем до 10% спирта, кислотность никогда не превышала 2%. При t —38° рост появлялся на 10-й день, при t 5—7° на 12-й. При t 28—30° через 48 час. На картофеле рост скудный с желтоватым оттенком, на сусловом агаре штрихом обильнее, блестящий. Полученный слабый уксус отличался исключительно приятным фруктовым ароматом. Мы считаем возможным отнести описанные бактерии к новому виду Acetobacter Nikitinsky.

Выделение подобных культур из естественно сложившегося комплекса дает нам повод высказать предположение, что в уксусном деле селекция может итти путем сочетания сильных кислотообразователей со слабыми, способными к ароматообразованию. В свое время Вейгманом [2] высказано было такое предположение для составления заквасок масла. В настоящее время точка зрения Вейгмана полностью оправдана.

Кроме того, из вращающегося генератора, вырабатывающего виноградный уксус, выделены бактерии без пленки. Указанный генератор был пущен на «эмпирической закваске» из смеси ленинградского уксуса с непастеризованным виноградным вином. При посеве уксуса на дне колбы образовывались крупинки, состоящие из коротких палочек с капсулой. Появление пленки обнаруживалось только через несколько пассажей. Максимальная кислотность достигала 11,3% на полузаводской установке. Оптимум роста 30°. Эти бактерии окисляли только глюкозу и галактозу. Испытанная культура на полузаводских установках давала хорошие выхода во вращающихся генераторах.

Выделенные бактерии можно считать за разновидность Bact. Schüzenbachi.

Хотя выделенная группа бактерий из виноградных уксусов была представлена значительно бо́льшим количеством видов (табл. 2), чем из природных условий, но не было выделено из производства такого

ценного вида, как Bact. orleanense. Поэтому вполне естественна была попытка выделить культуры из уксусообразователей скорого способа. Выделение производилось перманентно с 1938 по 1941 г. из уксусов, из стружек уксусообразователей московского, казанского, одесского и ленинградского заводов.

Таблица 2

Уксуснокислые бактерии из виноградных уксусов

№ культуры	Объект выделения	Вид	Морфология	Пленка	Кислотность в %	Вкус уксуса
$Г_1$	Виноградный уксус Тбилиси	Bact. xylinum	Длинные	Кожистая	6,6	Неприятный
$Г_2$		Bact. xylinoides	Палочки	Слизистая	8,5	Невыраженный
$Г_3$		Bact. xylinoides		Кожистая	6,6	Неприятный
8	Виноградный уксус	» aceti	Короткие палочки	Плотная	7,7	Чистый
9	из колхозов	» »	0,8 × 0,6 μ	»	5,2	»
10		» »	Цепочками	»	6,5	»
31	Восточной и Западной Грузии	Bact. ascendens	Палочки 1,0 × 0,7 μ	Высоко полвет вверх	6,3	Острый
38		Bact xylinoides	Палочки 0,9 × 0,6 μ	Слизистая	7,2	Невыраженный
7		Bact. xylinum	Палочки 1 × 0,6 μ	Кожистая	4,6	Неприятный
32		» rancens	Подвижные палочки	Нежная	7,0	Мягкий
31					2,5	Фруктовый
34		Acetobacter Nikitinsky	Кокко-бациллы	Сухая	1,4	
35				Точечная	2	Приятный
36			0,8—0,6 × × 0,6 μ		1,8	
37					1,6	

Решающее значение экологического фактора нашло блестящее подтверждение. Все говорило о специфичности ценоза. Наряду с «дикими» слизистыми и мутящими видами выделялись бактерии скорого способа, которые не удалось выделить из природных условий и винного уксуса, чувствительные к высоким концентрациям спирта, растущие на среде Геннеберга. Микрофлора московского завода оказалась пестрее. В прошлые годы завод работал иногда на вине. Этим надо объяснить нахождение бактерий другого типа, растущих на высококислотном вине (Bact. orleanense) (табл. 3), Bact. orleanense описана ниже более подробно.

Таблица 3

Уксуснокислые бактерии из уксусообразователей скорого способа

№ культуры	Вид	Сусло + 2% к-ты + 4% спирта			Винобелое (11% спирта)				Вино красное (13% спирта)				
		Дни											
		2	5	11	2	5	11	16	2	5	11	16	25
		Кислотность в %											
47-а	Бактерии типа Schüzenbachi	3	4,3	8,0	0,6	0,8	0,9	1,1	0,4	0,4	0,4	0,4	5,1
47-в		4,1	6,9	7,5		Не растет			Не растет				
51		4,2	6,9	7,2	0,8	0,8	0,8	2,4	0,4	0,4	0,4	0,7	4,0
51-а		6,1	7,8	8,2	0,8	0,8	0,8	2,2		Не растет			
51-с	Bact. orleanense . .	2,8	4,4	9,1	0,8	0,9	4,0	6,2	0,4	0,5	1,2	5,4	6,3

Bact. orleanense — 51-с

Ввиду того, что этот вид встречается редко и представляет интерес для производства, мы даем полное описание его морфологических и биохимических свойств. Этот микроорганизм выделен из 51-го уксусообразователя московского завода.

Бактерии на пиве, вине, сусле и сусловом агаре — неподвижные грамотрицательные палочки размером 0,8—0,6 μ × 0,5 μ, часто соединенные по две, редко образующие цепочки. Раствором иода окрашиваются в желтый цвет. По штриху на косом агаре рост отдельных нежных колоний, иногда наблюдается появление опаловых ореолов. На пивном и сусловом агаре на чашках колонии с ровными краями, иногда с центром посередине. При кислотности 5—7% наблюдается диссоциация на S- и R-формы. О-формы и слизистых пленок не наблюдалось. Геннеберг также описывает два типа колоний: «у штамма В, культивированного долгое время на сусле со спиртом, можно было наблюдать и влажные колонии и сухие, негладкие, с возвышением в центре». Пленка на вине, пиве и сусле плотная. Только в молодой культуре возможен пересев петлей. В старости пленка падает на дно целиком. Геннеберг указывает, что при изучении Bact. orleanense один раз из четырех обнаружено появление пленки типа Bact. xylinum. В течение 7 лет культивирования штамма 51-с в лабораторных условиях на сусле с 4% спирта, в среде Геннеберга и на сухом вине нам не удалось наблюдать появление кожистой пленки. В производственных условиях уплотнение и ослизнение пленки наблюдались при высокой кислотности затора и длительном сроке работы культуры. Пленка никогда не была кожистой и легко рвалась на куски. Особенно это было наглядно в пастеровских чанах под стеклянной крышкой с разной кислотностью (4, 5, 6, 8%). Предположение Геннеберга, что Bact. orleanense, Bact. xylinum Bact. xylinoides близки генетически, требует дальнейшего изучения. Так же, как и у Геннеберга, у нас наблюдалось сильное помутнение минеральной среды Геннеберга. На вине уксус получался прозрачный, с хорошим вкусом и букетом. Максимальная кислотность в колбах выше 10%, на производственных установках выше 11%. Культура 51-с не переокисляла при наличии 6—8% спирта.

Из углеводов окисляет: глюкозу, лактозу, рафинозу, галактозу, дульцит, пропиловый и этиловый спирты, хуже декстрин, арабинозу, сахарозу, маннит. Не окисляет: маннозы, рамнозы, крахмала, глицерина, бутилового, изобутилового, метилового, амилового и изоамилового спиртов. Оптимум роста 25—28°, при 37° слабый рост. Рост и кислотообразование наблюдались в широких температурных границах:

При t°	Появление пленки	Кислотность в %	
		через 5 дней	через 20 дней
30—33	24—48 час.	6,6	8,0
26—28	24—48 »	6,7	8,6
18—20	72 »	4,2	9,6
7—8	96 »	2,1	7,6

При добавлении 0,01% смеси солей $(NH_4)_2HPO_4$ и K_2HPO_4 кислотообразование штамма 51-с возрастает вдвое на виноградном и других винах.

Кислотность в % через 7 дней после инокуляции

Вино	Исходная кислотность в %	Вино + + соли	Вино без солей
Виноградное . . .	0,4	7,1	5,4
Яблочное	0,4	4,8	3,0
Сливовое	0,4	5,1	2,6
Абрикосовое . . .	0,6	5,3	1,3
Вишневое	1,6	3,4	1,6

Вышеуказанные данные учтены были при разработке методики размножения культуры в больших количествах при пуске новых уксусообразователей.

Несмотря на некоторые расхождения с данными Геннеберга об отношении бактерий к углеводам, мы сочли возможным отнести этот штамм к виду Bact. orleanense.

Ниже приводим данные сравнительной оценки штамма 51-с с 23 штаммами, выделенными нами и полученными из разных учреждений, в одинаковых условиях культивирования (возраст культуры, t° и среда).

Из табл. 4 видно, что 16 культур развивались на вине, содержащем 12,6% спирта. Не развивались в течение 20 дней культивирования: Bact. Schüzenbachi. Bact. curvum из бродильной лаборатории ЦНИЛБП, Bact. Kützingianum 10, Bact. Pasteurianum 11, Bact. xylinum 12 из Института микробиологии Академии Наук и Bact. aceti 424 из Института с.-х. микробиологии в Ленинграде.

Культура 51-с являлась более сильным кислотообразователем и при дегустации получила более высокую оценку.

Таблица 4

Сравнительное изучение кислотообразования на вине (12,6%) различными видами уксуснокислых бактерий

№	Вид		Откуда выделен или получен	Кислотность в %		Вкус уксуса
				дни		
				10	20	
1	Bact. orleanense .	51-с	Уксусообразователь	8,8	9,9	Чистый, ароматичный
2	» aceti . . .	9	Ин-т микроб. А Н	2,7	6,0	Чистый
3	» » . . .	168	Спиртов. ин-т	1,2	8,9	»
4	» » . . .	В	Виноград	6,8	8,5	Чистый, ароматичный
5	» » . . .	B_1	»	7,1	8,5	Чистый, ароматичный
6	» » . . .	U	Изюм	3,9	8,5	Чистый
7	» » . . .	C	Слива	4,1	6,7	»
8	» » . . .	2C	»	6,6	6,8	»
9	» » . . .	K	Клюква	5,9	6,3	»
10	» xylinoides .	1	Грузинский уксус	7,1	8,6	Невыраженный
11	» » .	2	» »	8,6	7,1	»
				Переокисление		
12	» » .	3	» »	1,4	7,5	»
13	» xylinum . .	11	Ин-т с.-х. микроб., Ленинград	7,5	7,5	Неприятный
				(смешанная)		
14	» rancens . .		Бродильная лаборатория	1,3	5,2	Мягкий
15	» ascendens .		Ленинград. уксус	—	8,8	Острый
16	типа Bact. Schüzenbachi . . .	$2Г_3$	Из вращающегося аппарата	—	8,8	Чистый

Из испытанных 9 штаммов Bact. aceti различного происхождения только штамм 424 не развивался на вине с 12,6% спирта. Уксус на этих культурах получался «чистый», в некоторых случаях ароматичный. На культуре Bact. rancens получен уксус с хорошим букетом. Уксус на культуре Bact. xylinoides «невыраженный» иногда неприятный. Культура переокисляла уксусную кислоту при наличии спирта (табл. 4).

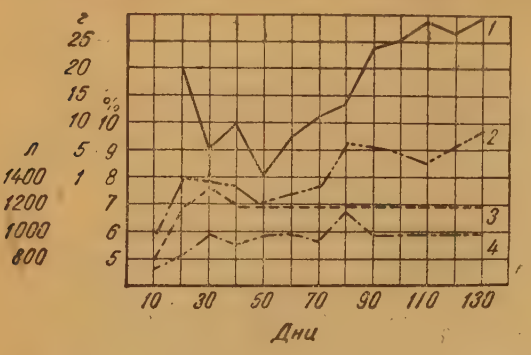


Рис. 1. Работа культуры 51-с в стеклянном аппарате

1 — производительность в граммах абсолютной уксусной кислоты; *2* — процент кислоты в сливе *3* — литраж затора; *4* — процент кислого затора

Кроме, того было составлено несколько комбинаций из различных культур сильных кислотообразователей. Никаких преимуществ они не имели по сравнению с монокультурой.

При испытании культуры Bact. orleanense 51-с, Bact. aceti B. и культуры типа Bact. Schüzenbachi 2 r_3 на полузаводских установках по орлеанскому методу преимущества имеются у штамма 51-с: более короткий срок пускового периода, в эксплоатационный период сроки сливов 4—12 дней и более высокая кислотность сливаемого уксуса.

Работа культуры 51-с испытана была в условиях скорого способа для получения 100—50% виноградного уксуса на полузаводских аппаратах (стеклянный, деревянный) и нормальном заводском аппарате.

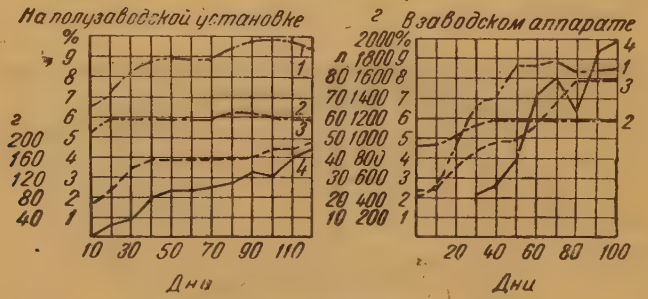


Рис. 2. Работа культуры 51-с

1 — процент кислоты в сливе; *2* — процент кислого затора; *3* — литраж затора *4*; —производительность в граммах абсолютной уксусной кислоты

Производительность в стеклянном аппарате достигала в течение трех месяцев работы 2,5 кг уксусной кислоты при пересчете на заводской аппарат в течение суток; в деревянном полузаводского типа до 5,5 кг; в заводском до 2—2,8 кг.

Штамм 51-с был разослан на многие производства виноградного и плодового уксуса.

В экспериментальной работе участвовали лаборанты Н. И. Шабанова и Н. А. Ермакова.

В заключение считаю своим долгом принести благодарность за консультации Н. Д. Иерусалимскому.

Выводы

1. Из различных природных источников, виноградных уксусов и уксусообразователей выделено и изучено около 100 штаммов уксусно-

кислых бактерий, развивающихся на вине, содержащем 11—13% спирта.

При сравнительной оценке различных видов наилучший по качеству уксус получен на культуре Bact. orleanense 51-с. Культура выделена из уксусообразователя московского завода.

2. Выделенная культура характеризуется стойкостью своих первоначальных свойств (кислотность 10% и выше в колбах, максимальная кислотность на полузаводских установках — 11,3%) и высокими вкусовыми качествами.

3. Испытанная на полузаводских и заводских установках по медленному и скорому способам характеризуется высокой производительностью. На полузаводских установках типа Шюценбаха производительность достигала 2,5—5,5 кг уксусной кислоты в течение суток при перерасчете на заводской уксусообразователь.

4. Производственно ценные штаммы выделялись как из уксусообразователей заводского типа, так и из виноградных уксусов различного происхождения.

Из плодов и ягод выделялись высококислотные штаммы, но значительно реже. Бактерии скорого способа выделялись только из уксусообразователей Шюценбаха.

5. Из грузинского уксуса кустарного производства выделен новый вид уксуснокислых бактерий, Acetobacter Nikitinsky, характеризующийся слабой кислотообразующей способностью, но приятным фруктовым запахом.

Получено 18 VII 1945

Центральная санитарно-гигиеническая лаборатория г. Москвы

ЛИТЕРАТУРА

1. Анненков М. Р. Применение чистых культур и изучение условий дополнительного питания в уксусном производстве. Консультации изд. УНИИПП, Харьков, 1939.
2. Вейгман, цит. по Королеву С. А. Основы технической микробиологии молочного дела, 1932.
3. Гамова-Каюкова Н. И., Рович С. В., и Шабанова Н. И. Пуск уксусного цеха на Серпуховском плодоовощном комбинате. Рукопись, ВНИЛУ, 1939.
4. Гамова-Каюкова Н. И. и Рович С. В. Подбор уксусных культур для производства уксуса по скорому способу. Рукопись, ВНИЛУ, 1939.
5. Креслинг Е. К. Окисление сорбита при помощи микробов. Микробиология, т. VI, вып. V, 1937.
6. Мантейфель А. Я. и Иерусалимский Н. Д. Повышение производительности действующего уксусного завода путем внедрения культурных рас бактерий. Сборник ЦНИЛБП, стр. 57, 1940.
7. Мантейфель А. Я., Зыкова К. Н. и Дульман Г. М. Выделение и изучение уксусных бактерий. Там же, стр. 3.
8. Мантейфель А. Я. Применение чистых культур в уксусном производстве. Микробиология, т. 8, вып. 3—4, 1939.
9. Пастер Л. Исследование о брожениях. Мемуары об уксуснокислом брожении 1868 г. Изд. 1937 г.
10. Ротмистров М. Н. Изучение микрофлоры окислителей Харьковского уксусного завода, Киев, 1938.
11. Шаинская И. К вопросу микробиологии уксусного производства. Микробиологич. журн. ВУАН, 1934, № 1.
12. Шапошников В. Н., Дульман Т. М. и Бехтерева М. Н. Пуск уксусн. завода в Казани на культуре Bact. curvum. Сбор. ЦНИЛП 1940.
13. Уткин С. Л. О новом микроорганизме из группы уксуснокислых бактерий. Микробиология, т. VI, вып. 4, 1937.
14. Beijerinck W. Ueber die Arten der Essigbakt. Ctbl. Bakt., Abt. II,4, 204, 1898.
15. Brown, On an acetic ferment which forms cellulose. J. chem. Soc., 49, 432, 1886.
16. Hansen E. S. Mycoderma aceti u. Mycoderma Pasteurianum Ctbl. Bakt., Abt. II. 4, 209, 1879.
17. Hansen E. S. Recherches sur les bacteries acetifiants. C. R. des travaux du laboratoire de Carlsb., 3, 182, 1894.

18. Henneberg W. Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien. Ctbl. Bakt, Abt. II, Bd. III, 223, 1897.
19. Henneberg W. Handb. der Gärungsbakt. Berlin 1925.
20. Herman S. Uber die sogenannte «Kombucha» Biochem. Z., Bd. 1—3, 192, 1928.
21. Kluyver A. and dé Leeuw J. G, Acetobacter suboxydans, eine merkwürdige Essigbakterie. Ctbl. Bakt., Abt. II. 68, 404, 1926.
22. Kreham M. Arch. f. Microb., 1, 493, 1930.
23. Lindner A. Bemerkung zur Arbeit D-r Henneberg. Ctbl. Bakt. Abt. II, 15, 339, 1897.
24. Perold A. S. Untersuchungen über Weinessigbacterien Ctbl. Bakt. Abt. II, 24, 13, 1909.
25. Seifert W. Beiträge zur Physiologie und Morphologie der Essigbakterien Ctbl. Bakt., Abt. II, 337, 385, 1897.
26. Steinmetz. The construction of Modern of vinegar plants. The fruits products. J. Amer. vinegar Ind., 299, 313, 1935.
27. Vandecavey S. C. Studies on certain non-pellicule Form Vinegar, J. Bakt. 14, 116, 1927.
28. Wyant, Z. A. vinegar Michig. Agricul. Exp. Sta., 98. 27, 1919.
29. Zeidler A. Bemerkung zu der Arbeit von D-r. Henneberg. Ctbl. Bakt. Abt II, Bd. IV, 399, 1897.

SELECTION OF THE ACETIC-ACID BACTERIA

N. I. Gamova-Kajukova

Summary

1. It was isolated and studied from different natural sources, grape vinegars, and acetous tanks about 100 stocks of the acetic-acid bacteria growing in the wine, containing 11—13 per cent of alcohol. As the comparison of different species showed the best vinegar was obtained from the stock of Bact. orleanense 51-c. The stock was isolated from the acetous tank of Moscow factory.

2. The isolated stock is characterized by the constancy of original peculiarities (the acidity in the flask is 10 per cent and higher; the maximal acidity in acctous tank is 11.3 per cent) and by high flavour qualities.

3. Being tested in factorial and industrial and semi-industrial conditions by slow and fast methods the stock was found to be characterized by the high degree of productivity, the latter being equal in Schüzenbach's settings to 2.5—5.5 kg of acetic acid per 24 hours as estimated for the factorial acetous tank.

4. The stocks valuable from economical point of view have been selected both from the factory acetous tanks and from the grape vinegars of different origin. From fruits and berries were selected races characterizing by high acidity but in fewer cases. The bacteria of the fast method were isolated only from Schüzenbach's acetous tanks.

5. From Georgian vinegar of household production a new species of the acetic bacteria—Acetobacter Nikitinsky was isolated. This species is characterized by its low acid-forming ability and nice smell.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБКА ASPERGILLUS NIGER

Н. А. Красильников и *А. И. Кореняко*

После того как Florey [10] в 1941 г. получил из P. notatum замечательное вещество пенициллин в очищенном виде, интерес к плесневым грибкам необычайно возрос. За 2—3 года изучено большое количество этих грибков и среди них обнаружено много видов с антибактериальными свойствами.

По исследованиям Wilkins и Harris [26], эти свойства обнаруживаются преимущественно у представителей родов Aspergillus и Penicillium. Описано более 15 препаратов, полученных из этих организмов, а именно:

Пенициллин из P. notatum (Flemming [8])
Пеницидин из P. notatum (Atkinson [3])
Спинулозин из P. spinulosum (Oxford [19])
Нотатин (пенициллин A) из P. notatum (Coulthard и др. [6])
Пенициллин B из P. notatum (Bruggen [14])
Пенатин из P. notatum (Kocholaty [16])
Клавиформин из P. claviforme (Wilkins и Harris [26])
Цитринин из P. citrinum (Raistric [20])
Патулин из P. patulum (Hooper [13])

Из культур аспергиллуса получены:

Фумигатин из A. fumigatus (Oxford [19])
Гельволевая к-та из A. fumigatus (Chain и Florey [7])
Фумигацин из A. fumigatus (Waksman [23])
Аспергиллевая к-та из A. flavus (White [25])
Флавецидин из A. flavus (McKee [18])
Флавецин из A. flavus (Buch and Goth [5])
Клавецин из A. clavatus (Waksman [24])
Пенициллин из A. flavipes (White [25])

В своих исследованиях мы испытали более 120 видов плесневых грибков, выделенных из почвы, воздуха и разных субстратов. Проверяя антибактериальные свойства на культурах Staphylococcus aureus и B. coli, мы могли их обнаружить лишь у немногих видов Aspergillus (7 из 22 штаммов), Penicillium (5 из 27 штаммов) и у (одного из 12 штаммов) Fusarium. Мы не обнаружили антибактериальных свойств у представителей: Mucor (15 штаммов), Trichoderma (5 штаммов), Verticillium (3 штамма), Cephalosporium (3 штамма), Chaetonium (2 штамма), Cladosporium (5 штаммов), Foma (4 штамма), Dematium (9 штаммов), Endomyces (4 штамма), Saccharomyces (7 штаммов) и Torula (6 штаммов).

В дальнейших исследованиях мы сконцентрировали внимание на культурах грибка Aspergillus niger. Этот грибок до сих пор оставался вне сферы внимания исследователей и не упоминается в литературе как продуцент антибактериальных веществ.

Только в самое последнее время в работе Jackson (14) он упоминается, притом без описания опытов и вещества. По нашим наблюдениям, не все штаммы этого вида обладают антибактериальными свойствами. Из 8 культур, имевшихся в нашем распоряжении, 3 угнетали рост стафилококков, но не убивали их, а один штамм был бактерициден для стафилококков и кишечной палочки. Этот последний штамм был взят нами для получения активного вещества.

Культура грибка выращивалась в колбах на минеральном питательном растворе следующего состава: дистиллированная вода 1 000 г, K_2HPO_4 — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; KNO_3 — 1,0 г; $FeSO_4$ — 0,001 г; сахароза — 2%.

Через 4—5 дней при 25° С образуется на поверхности среды мощная пленка грибка с черным плодоношением, а через 10—15 суток накапливается максимальное количество бактериального вещества.

Раствор из-под культуры сливается, фильтруется через бумажный фильтр, выпаривается, полученный осадок обрабатывается эфиром, затем спиртом. В конечном итоге получаем спиртовую фракцию активного вещества, названного нами предварительно аспергиллином. Из одного литра жидкой культуры получается 100 см³ спиртового раствора аспергиллина с 5 000—10 000 оксфордовских единиц в 1 см³. В кристаллическом виде аспергиллин не получен.

Спиртовая фракция аспергиллина бесцветна или цвета слабого чая, бледножелтая, прозрачная, с приятным, очень нежным запахом, на вкус — кисловатая. Аспергиллин устойчив, не разрушается при длительном хранении (в течение 6 м.) при обычных лабораторных условиях; в стеклянной посуде, на рассеянном свету, препарат сохраняется полностью при 30-минутном нагревании при 70°, инактивируется в 10 мин., при 110°, как показали исследования Сахарова, аспергиллин не токсичен для животных.

Антибактериальные свойства аспергиллина испытывались на многих видах бактерий, а в основных опытах на двух: на Staphylococcus aureus штамм X (тест-объект для установления доз препарата) и на культуре B. coli. Испытания производились двумя методами: 1) метод посева тест-организма на агаровую среду (МПА) в чашки Петри с последующим нанесением капли препарата, разведенного до известного предела. По зоне отсутствия роста на месте растекания капли препарата определялась его активность. 2) Метод посева тест-организма в жидкую среду (МПБ) с одновременным внесением в нее определенного количества препарата. Для установления бактерицидного действия аспергиллина производился высев бактерий из этих пробирок на обычный бульон и агар.

Как уже отмечалось одним из нас [1], аспергиллин действует на грамположительные бактерии — на микрококки, стрептококки, микококки, микобактерии и коринебактерии, а также на некоторые виды грамотрицательных бактерий B. coli Ps. pyocyanea, B. proteus и др.

Таблица 1

Действие аспергиллина на микроорганизмы. Опыты с МПБ. Рост бактерий при разных дозах препарата
(Число единиц в 1 см³ среды)

Испытание бактерий	Рост бактерий			Испытание бактерий	Рост бактерий			
	500	100	50		1 000	500	100	50
Staphylococcus	—	—	—	B. mycoides	—	+	+	+
Streptococcus	—	—	—	B. sybtilis	—	+	+	+
Micrococcus	—	—	+	B. mesentericus	—	—	+	+
Mycobacterium	—	—	+	B. asteroides	—	—	+	+
Corynebacterium	—	—	+	Saccharomyces	+	+	+	+
B. coli	—	—	+	Torulopsis	+	+	+	+
B. proteus	—	—	±					
Ps. pyocyanea	—	—	+					
Ps. fluorescens	—	—	+					
Rhizobium	—	+	+					
Azotobacter	—	—	+					

Аспергиллин слабо действует на спороносные аэробные бактерии и совсем не действует на дрожжи.

Действие аспергиллина может быть либо бактериостатическим либо бактерицидным — в зависимости от концентрации его, состава среды, в которой производится испытание, и от чувствительности штаммов.

Сравнительное изучение аспергиллина, мицетина (другой препарат, полученный нами от Actinomyces violaceus и стрептоцида в искусственной питательной среде) показало, что аспергиллин в условиях чистых культур действует слабее, чем мицетин, на грамположительную микрофлору и примерно одинаков по силе действия со стрептоцидом.

Но если сравнивать действие этих препаратов в более сложных средах, например, в гное или в кровяной сыворотке, то наблюдается явное преимущество аспергиллина. В гное аспергиллин значительно сильнее угнетает рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (табл. 2), чем другие препараты.

Таблица 2

Сравнительное действие препаратов на бактерии в МПБ и в гное. Число штаммов развивающихся в присутствии препаратов

Бактерии	Число испыт. штаммов	Мицетин		Аспергиллин		Стрептоцид	
		в гное	в МПБ	в гное	в МПБ	в гное	в МПБ
Staphylococcus aureus	25	5	1	6	8	15	10
Strept. hemolyticus	22	8	4	7	6	16	10
B. coli	12	12	12	2	4	11	10
B. proteus	10	10	10	1	6	7	7

Из табл. 2 видно, что далеко не все штаммы одинаково реагируют на действие препаратов. Одни погибают, другие сохраняются или даже развиваются. Мы имели штаммы, которые выдерживали в 10—15 раз более высокую концентрацию аспергиллина, чем тест-организм. То же наблюдается и среди других видов бактерий. Различную чувствительность к пенициллину наблюдали у разных штаммов бактерий Hobby, Meyer (12) и др.

Как видно из таблицы, мицетин и стрептоцид значительно сильнее действуют в МПБ, чем в гное, (антибактериальные свойства этих препаратов еще резче выявляются в чистой воде или в минеральных растворах). Аспергиллин одинаково активен как в МПБ, так и в гное. В этом его преимущество.

При обработке препаратами гноя, взятого из огнестрельных осложненных остеомиэлитом ран больных, получались сходные результаты. Наибольшее число стерильных проб было получено в тех случаях, когда гной обрабатывался аспергиллином (табл. 3).

Аналогичные данные получаются при обработке препаратами инфи-

Таблица 3

Число стерильных проб гноя, обработанных аспергиллином, мицетином и стрептоцидом. Всего испытано 64 пробы

Получено проб	Аспергиллин	Мицетин	Стрептоцид
Стерильных	42	2	9
Частично стерильных	8	25	14
Без видимого изменения микрофлоры	14	37	41

цированных ран. В 25 случаях леченных ран аспергиллином быстрое и резкое уменьшение микрофлоры было в 18 случаях, а при лечении стрептоцидом из 37 только в 12 случаях.

Полного устранения микрофлоры в ранах мы не наблюдали ни в одном случае при лечении не только указанными препаратами, но и многими другими. Как правило, в ранах, хорошо поддающихся лечению, остаются до конца излечения стрептококки и микококки. Надо полагать, что эти организмы не препятствовали благоприятному течению процесса регенерации ткани у наблюдаемых больных.

Сопоставляя «бактериологический спектр»[1] аспергиллина с таковым флавицина и пенициллина полученных от Aspergillus flavus и P. hotatum Ваксманом, мы можем сказать, что изученный нами препарат ближе стоит к пенициллину (табл. 4).

Таблица 4

«Бактериологический спектр» антибиотических веществ A. flavus, A. niger и P. notatum. Число единиц в 1 см³ фильтрата

Тест-организмы	По Ваксману		Собственные наблюдения A. niger
	A. flavus	P. notatum	
Staphylococcus aureus	200	400	100
Sarcina lutea	500	1 000	300
B. subtilis	15	20	3
B. mycoides	10	10	0—1
Shigella	10	10	50

Таблица 5

Стимулирующее действие аспергиллина на рост микробов тест-объектов

Опыт	Число клеток в тыс. на 1 см³		Рост гриб. Phycomyces
	Str. lactis	Saccharomyces cerevisiae	
Контроль .	12	8	—
Аспергиллин . .	4 500	100	—

Отличительной его особенностью является способность угнетать и умерщвлять грамотрицательные бактерии, устойчивость к температуре, сохраняемость при длительном хранении.

Мы не имеем аспергиллина в кристаллически чистом виде, а поэтому он может оказаться не однородным или состоять из нескольких компонентов, подобно тому, как это отмечается у A. fumigatus, A. flavus и др. (23). Возможно, что наблюдаемые расхождения с пенициллином обусловлены наличием двух или более компонентов.

Весьма существенным качеством в характеристике аспергиллина является способность его активизировать биологические процессы в организме. В настоящее время известно, что многие микроорганизмы, в том числе и грибки, образуют дополнительные вещества роста, витамины и производные их.

У представителей рода Aspergillus различные авторы находили витамины. Sakurai [21] обнаружил витамин B_1 у A. niger, A. Oryzae и др. По наблюдению Lavollay [17] A. flavus образуют рибофлавии. То же отмечает и Понтович [2].

По нашим наблюдениям, культура A. niger образует несколько активирующих веществ. Аспергиллин, прибавленный в небольших порциях к синтетической питательной среде, обеспечивает заметный рост молочнокислых стрептококков (табл. 5), которые, как известно, реагируют на рибофлавин, пиродоксин и фолевую кислоту (Keresziesi [15]) I. Snell [22].

С другой стороны, этот препарат способствует росту дрожжей S. cerevisiae, которые хорошо отзываются на тиамин, пиродоксин Gyorgy [11]. На рост грибка Phycomyces аспергиллин не действует.

[1] Применяемый американцами термин (Ваксман и др.) означает избирательное отношение антибиологических веществ к разным видам бактерий. Данное явление служит хорошим опознавательным признаком при установлении новых антибактериальных веществ.

Не действуя на рост грибов фикомицета, аспергиллин оказывает заметную стимуляцию полового процесса его.

По нашим наблюдениям плюс- и минус-вариантов данного грибка, при совместном высеве на специальной синтетической среде половые клетки не соединяются и не образуют зигот, но если к среде прибавить небольшие дозы аспергиллина, клетки-гаметы приходят в соприкосновение, копулируют и образуют зиготы. По количеству зигот можно, примерно, определить степень стимуляции препарата. При применении химически чистых, заранее известных витаминов нами было установлено, что подобную стимуляцию полового процесса у Phycomyces производит инозитол. Изучение активирующей функции аспергилла нами продолжается.

Выводы

1. Некоторые штаммы грибка Aspergillus niger образуют антибактериальное вещество. Оно получено в виде спиртовой фракции и названо аспергиллином. Оно устойчиво, не разрушается при нагревании и длительном хранении.

2. Аспергиллин действует бактериостатически и бактерицидно на грамположительные и грамотрицательные бактерии, слабо действует на спороносные аэробы и совсем не действует на дрожжевые грибки.

3. Антибактериальное действие аспергиллина не снижается или снижается очень мало в естественных субстратах — в гное, в сыворотке и непосредственно в ранах.

4. По бактерицидному действию аспергиллин похож на пенициллин. Отличается, однако, способностью угнетать рост грамотрицательных бактерий и большей стокойстью.

5. Аспергиллин обладает способностью биокатализа, содержит вещества, сходные по своему действию с рибофлавином, возможно, содержит пиродоксин, инозитол и фолевую кислоту.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 13 IV 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников Н. Влияние лечебных препаратов на микрофлору ран. Журн. микробиол., эпидем. и иммун., № 9, стр. 63, 1944.
2. Понтович В. Aspergillus flavus как источники флавина. Биохимия, т. 8, № 5—6, 1943.
3. Atkinson N. Antibacterial substances produced by moulds 1. Penicidin, a product, of the growth of Penicillium. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 20, № 4, 1942.
4. Bruggen T., Rhithel F., Cain C., Katzman Ph. and Doisy E. Penicillin B. Preparation, purification and mode of action. J. Biol. Chem., 148, № 2, 1943.
5. Bush M. and Goth H. Flavicin: An antibactericid substance produced by an Aspergillus flavus. J. Pharm. Exp. Therapy, 78, p. 164. 1943.
6. Coulthard C., Short, Michaelis R. Skrimshire G. et al. Notatin: an anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from Penicillium notatum Westling. Nature, 150, p. 635. No. 3813, 1942.
7. Chain E., Florey H., Jenning M. and Williams T. Helvolic acid on antibiotic produced by Aspergillus fumigatus, mut. Helvola. Brit. J. Exp. Pathol., 24, No. 3, 1943.
8. Flemming A. Цит. по Flemming (9).
9. Flemming A. The mode of action of chemotherapeutic agents. Bioch. J., 36. p. 1, 1942.
10. Florey H. Penicillin: its development for medical uses. Nature, 153, p. 40, No 3871, 1944.
11. Gyorgy P. The water-soluble vitamins. Ann. Rev. Biochem., XI, p. 309, 1942.
12. Hobby G., Meyer K. and Chaffes E. Activity of penicillin *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 50 277, 1942.
13. Hooper J., Anderch H., Skell R. and Earter H. The identity of clavicin with patulin. Science, 29, p. 16, 1944.
14. Jackson W., Foster and Edward O. The production of Penicillin by various fungi, J. Bact., 48, No. 2, p. 260, 1944.

15. Keresztesi J., Riches E., Stokes J. A. new growth factor for Streptococcus lactis. Sciences, 97, No. 2525. 1934.
16. Kocholaty W. Penatin the second antibacterial substances produced by Penicillium notatum Westling 77. J. Bact. 46. No. 3, p. 313, 1943.
17. Lavollay J. et Laborey F. Caracterisation de la lactoflavine produite par Aspergillus niger etc. C. R., 208, p. 1056, 1939.
18. Mc Kee and Mc Phyllamy H. An antibiotic substances produced by Submerged cultivation of Aspergillus flavus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 53, p. 247, 1943.
19. Oxford A. Anti-bacterial substances from moulds. Biochem. J., 36, p. 438, 1942. Chem a. Ind., p. 128, 189, 1942.
20. Raistrick H. and Smith G. Anti-bacterial substances from moulds I. Citrinin a metabolic products of Penicillium citrium. Thom. chem. Ind., p. 828, 1941.
21. Sakurai K. Vitamin B 1 — Synthese bei Mikroorganismen. II. Ueber die Schimmelpilze. J. Sci. Hirosima Univ/, 4. No. 1—5, 1940.
22. Snell E. and Guirard B. Some interrekationships of pyrodoxine alanine and glycine in their effect on certain lactic acid bacteria. Proc. Nat. Acad, Sci., 29, 66, 1943.
23. Waksman S. and Geiger W. The nature of the antibiotic substances produced by Aspergillus fumigatus. J. Bact., 47, No. 4, 1944.
24. Waksman S. and Schatz A. Strain specificity and production of antibiotic substances. Proc. Nat. Ac. Sci., 29, p. 74, No. 2 No. 9 1943; 30 No, 5, 1944.
25. White E. Antibacterial filtrates from cultures of Aspergillus flavipes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 54, No. 2, 1943.
26. Wilkins W. and Harris G. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Brit. J. Exp. Path., 23, No. 4, 1942.

ANTIBACTERIAL PECULIARITIES OF ASPERGILLUS NIGER

N. A. Krassilnikov and *A. I. Koreniako*

Summary

1. Some strains of Aspergillus niger are able to produce antibacterial substances. It was obtained as a alkohol fraction and called aspergillin. It is stable, not destroying by heating or long storage.

2. Aspergillin possesses the bacteriostatic and bactericidic action on the gram-positive and gram-negative bacteria, shows weak influence upon the spore-bearing aerobes bacteries and no influence upon the yeast fungi.

3. Antibacterial action of aspergillin is not decreased or decreased very little in the natural substrata like pus, serum as well as immediately in the wounds.

4. Bactericidic action of aspergillin is similar to that of penicillin. The difference, however, is inhibition of the growth of the gram-negative bacteria and higher stability.

5. Aspergillin is possessing the biocatalyzing ability contains the substances similar on their action to riboflavin, possibly contains pirodoxin, inositol and folie acid.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ОПЫТЫ ПО ХИМИОТЕРАПИИ ЖЕЛТУХИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

В. Л. Рыжков и *Е. А. Гигаури*

В основу этой работы было положено предположение, что введение в животное различных веществ, в особенности таких, которые воздействуют на окислительно-восстановительные процессы, может способствовать подавлению синтеза вирусных белков. Мысль об этом пути борьбы с желтухой шелкопряда была высказана нами еще в 1940 г. на совещании по желтухе шелкопряда, созванном в Москве ВАСХНИЛом.

В настоящей работе было испытано действие динитрофеноза — вещества, которое, как известно, может усиливать окислительные процессы в животных организмах; перманганата, так как ионы марганца предположительно также могли усиливать окислительные и другие ферментативные процессы; фовлеров растворов, как мышьяковистый препарат, учитывая, что мышьяк может играть в организме роль переносчика кислорода; сульфазола и стрептоцида, как сульфамиламиды и, наконец, риванола. Действие риванола мы испытали потому, что в опытах на растениях было обнаружено, что это вещество может останавливать инфекционный процесс, вызываемый вирусом. По той же причине первоначальные и ориентировочные опыты были сделаны с тиамином.

Первая ориентировочная серия опытов была поставлена таким образом, что гусениц тутового шелкопряда второго возраста (японская бивольтинная порода) за день до заражения начали кормить листьями, смоченными в растворах тиамина (1 : 10 000 — 5 000), динитрофенола (1 : 5 000), белого стрептоцида (0,1 г на 20 см³ воды) и сульфазола (0,05 г на 5 см³ воды). Первый день гусеницы получали 0,1 см³ соответствующего раствора или взвеси, а в последующие 2 раза в день по 0,2 см³. На другой день после начала опыта все гусеницы были заражены при помощи гемолимфы больной гусеницы, которой смачивался корм. Опыт был заложен 17 мая, а к 31 мая в нелеченном контроле все гусеницы были больны, тогда как в леченных сериях осталось в каждой по 3—5 гусениц здоровых. Общее количество опытных животных здесь, однако, было очень небольшим. В каждой серии опыта, а также в контроле было только по 10 гусениц. В дальнейшем было поставлено еще 2 серии опытов, причем в каждой из этих серий часть гусениц начинали лечить через сутки после заражения, а часть подвергали действию тех же веществ за 2 суток до заражения. Кроме того, имелось 2 контроля, один контроль, который подвергался заражению и не лечился, и другой контроль, оставленный вовсе без заражения. В первой из этих серий опытов для каждого опыта было взято по 40 гусениц, всего 40 гусениц, а во второй серии было взято по 50 гусениц для каждого опыта, всего 1 000 гусениц. Данные по первому из этих опытов приводятся в табл. 1, а по второму — в табл. 2. Гусеницы подвергались кормлению соответствующим веществом 2 раза в день, причем каждый раз использовалось 5 см³ соответствующего раствора. В первой серии опытов была взята порода «Тбилиси № 1», второй день третьего возраста, а во второй серии гибрид «Асколи» и бивальтинная, первый день третьего возраста. Следует отметить, что некоторые рас-

Таблица 1

Первая серия опытов по химиопрофилактике и химиотерапии желтухи тутового шелкопряда

Вещество	Концентрация в %	% больных червей	Примечание
	0,1	10	За 2 суток до заражения
	0,05	2,3	
Динитрофенол	Насыщ.	2,3	
Белый стрептоцид	0,5	7,5	
	1,0	7,5	
Сульфазол	0,5	10	
	0,025	10	
	0,1	15	Через сутки после заражения
	0,5	15	
Динитрофенол	Насыщ.	20	
Белый стрептоцид	0,5	7,5	
	1,0	7,5	
Сульфазол	0,05	30	
	0,025	12,5	
Контроль зараженный		0	
» незараженный		20	

творы делали пищу для гусениц непривлекательной. Так, гусеницы очень плохо употребляли листья, смоченные тиамином, фовлеровым раствором и риванолом. При обсуждении результатов опыта особенно следует учитывать, что два последних вещества гусеницы употребляли неохотно, поэтому неизвестно, попадали ли они в организм гусениц в достаточном количестве.

Из приведенных таблиц прежде всего видно с полной очевидностью, что в тех случаях, когда лечение было начато через сутки после зара-

Таблица 2

Вторая серия опытов по химиопрофилактике и химиотерапии желтухи тутового шелкопряда

Вещество	Концентрация в %	% больных червей	Примечание
	0,1	6	За 2 суток до заражения
	0,05	2	
Динитрофенол	Насыщ.	6	
Белый стрептоцид	0,5	0	
	1,0	4	
Риванол	1,0	36	
	0,1	24	
Фовлеров раствор	0,1	18	
	0,01	12	
	0,1	18	Через сутки после заражения
	0,05	26	
Динитрофенол	Насыщ.	26	
Белый стрептоцид	0,5	28	
	1,0	26	
Риванол	1,0	36	
	0,1	28	
Фовлеров раствор	0,1	38	
	0,01	34	
Контроль зараженный		44	
» незараженный		0	

жения, оно не оказало никакого влияния на количество погибших от желтухи личинок. Точно так же не эффективными оказались риванол и фовлеров раствор, даже в тех случаях, когда они были применены за 2 суток до заражения. Так как гусеницы неохотно ели листья, смоченные этими веществами, то трудно судить, в каких количествах они поступали в организм гусениц. Следует отметить также, что при кормлении обоими разведениями фовлерова раствора и 1% раствором риванола часть гусениц погибла от ядовитого действия этих веществ. Наряду с таким отрицательным результатом части опыта обращает на себя внимание низкий процент погибших от желтухи гусениц в тех случаях, когда их начинали за 2 суток до заражения кормить перманганатом, динитрофенолом, белым стрептоцидом или сульфазолом. Вторая серия опытов в этом отношении дает особенно определенный ответ. Если бы в нашем распоряжении была только эта вторая серия, то мы могли бы считать высокую эффективность примененных препаратов доказанной. К сожалению, в первой серии опытов эффект химиопрофилактики не был таким значительным. Кроме того, в этой серии процент погибших червей вообще колеблется более значительно, так, например: 0,1% раствор перманганата дал 10% больных гусениц, а 0,05% раствор того же вещества дал только 2,5% больных гусениц. Эти колебания следует считать случайными, а не зависящими от большей эффективности более низких концентраций перманганата. Кроме того, и в первой серии опытов зараженный контроль вовсе не дал заболеваний, что снова заставляет относиться с некоторой осторожностью к данным этой серии. Эти соображения, конечно, должны отразиться и на оценке результатов второй серии в том отношении, что не считать их окончательными и считать необходимым дальнейшее повторение опыта.

Эти критические соображения, однако, не могут помешать нам видеть определенную тенденцию полученных цифр. Во всех опытах процент больных гусениц выше там, где лечение начато через сутки после заражения, чем там, где оно начато за 2 суток до заражения. Особый интерес представляет эффективность перманганата, который безусловно должен быть испытан в более широких опытах, в которых учитывалось бы не только возможное профилактическое значение этого вещества по отношению к желтухе, но также и возможное влияние его на рост и развитие гусениц, а также на качество завиваемых коконов. Представляют интерес и наши опыты со стрептоцидом. Это вещество, которое так легко переносили гусеницы, вероятно, окажется эффективным, если не при желтухе, то при септических заболеваниях шелкопряда.

Нам представляется, что мы можем полученные результаты квалифицировать не иначе как перспективные, хотя и нуждающиеся в дальнейшей проверке и в дальнейшем изучении.

В дальнейшем необходимо испытать также целый ряд других препаратов. Наши опыты показывают, наконец, что тутовый шелкопряд может быть удобной моделью при изучении общих вопросов химиотерапии вирусных заболеваний.

Получено 10.I.1945

Институт микробиологии
Академии Наук СССР.
Москва

THE EXPERIMENTS ON CHEMOTHERAPY OF JAUNDICE IN BOMBYX MORI

V. L. Rischkow and *E. A. Gigaury*

Summary

It was tested the influence of $KMnO_4$, dinitrophenol, some sulphanilamides, rivanol, kalium arsenite (Sol. Fovl.) on the development of jaundice in Bombyx mori.

If the substance mentioned were given after infection no influence was observed upon the development of the desease.

If $KMnO_4$ dinitrophenol or sulphanilamides were given to Bombyx mori two days before infection per cent of the deseased individuals was decreased.

In the same conditions rivanol and Sol. Fovl. showed no effect on the development of the desease.

The further extensive experiments are necessary for the final decision of the problem as to the prophylactic effect of some substances on the development of jaundice in Bombyx mori.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Луи Пастер 297

Н. Ф. Саенко. Расообразование у дрожжей Saccharomyces ellipsoideus и Saccharomyces apiculatus в условиях симбиоза 299

Л. Г. Логинова. Адаптация дрожжей. Кратковременное действие внешних факторов 310

А. М. Фролов-Багреев и Н. Ф. Саенко. О дрожжах, выделенных из хересной пленки 320

А. А. Имшенецкий и Л. И. Солнцева. Термофильные маслянокислые бактерии 324

З. А. Канунникова. Зависимость биохимической активности молочнокислых бактерий (B. Delbrückii) от возраста культуры . . 330

Н. И. Гамова-Каюкова. Селекция уксуснокислых бактерий . . 338

Н. А. Красильников и А. И. Кореняко. Антибактериальные свойства грибка Aspergillus niger 347

В. Л. Рыжков и Е. А. Гигаури. Опыты по химиотерапии желтухи тутового шелкопряда 353

CONTENTS

Luis Pasteur 297

N. F. Saenko. Formation of the races in Saccharomyces ellipsoideus and Saccharomyces apiculatus 309

L. G. Loginova. Adaptation in the yeast 319

A. M. Frolov-Bagreev and N. F. Saenko. The yeast isolated from the sherry film 323

A. A. Imšenecki and L. I. Solnzeva. Thermophylic butyric-acid bacteria 329

Z. A. Kanunnikova. Dependence of biochemical activity of the lactic-acid bacteria (B. Delbrückii) upon the age of culture 337

N. I. Gamova-Kajukova. Selection of the acetic-acid bacteria 346

N. A. Krassilnikov and A. I. Koreniako. Antibacterial peculiarities of Aspergillus niger 352

V. L. Rischkow and E. A. Gigauri. The experiments on chemotherapy of jaundice in Bombyx mori 356

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

Подписано в печать I.X 1945 г. 3¾ печ. л.+2 вклейки 5,75 уч.-изд. л.
А122271 Заказ № 668 Цена 8 руб. Тираж 2500 экз.

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский, пер. 10

Цена 8 руб.